



Universidade Nova de Lisboa

Desenvolvimento de métodos moleculares
para deteção de *Trypanosoma* spp. em
glossinas (Diptera: Glossinidae) da
República da Guiné-Bissau

Carlos André Filipe da Silva Nazário

DISSERTAÇÃO PARA A OBTENÇÃO DO GRAU DE MESTRE EM
SAÚDE TROPICAL

FEVEREIRO DE 2012



Universidade Nova de Lisboa

**Desenvolvimento de métodos moleculares
para deteção de *Trypanosoma* spp. em
glossinas (Diptera: Glossinidae) da
República da Guiné-Bissau**

Carlos André Filipe da Silva Nazário

Licenciado em Análises Clínicas e Saúde Pública

Dissertação apresentada para cumprimento dos requisitos necessários à
obtenção do grau de Mestre em Saúde Tropical

ORIENTADORES: Doutor Nuno Rolão e Doutor Jorge Atougua

FEVEREIRO DE 2012

Para a Rita,

Agradecimentos

Gostava aqui de expressar os meus mais sinceros agradecimentos:

Ao meu Orientador, Doutor Nuno Rolão, pela imensa disponibilidade, pela valiosíssima ajuda, e pela amizade que espero que continue.

Ao meu Professor e Co-orientador, Doutor Jorge Atougua, por ter despertado em mim o interesse pela parasitologia, e pela confiança que sempre demonstrou ter no meu trabalho, que me fez confiar mais em mim.

À Professora Sónia Lima, pela boa disposição, e por todas as “dificuldades” criadas, que só ajudaram a elevar a qualidade final do trabalho.

Ao Professor Jorge Seixas, pela amizade e simpatia.

À Filipa Ferreira e Rúben Rodrigues, por toda a ajuda, disponibilidade e companhia durante as longas tardes de trabalho e escrita.

Ao meu amigo e irmão João Silva, que mesmo longe se manteve por perto.

Ao meu irmão e amigo Peter John. Bem vindo de volta.

Aos meus pais, por me terem acompanhado nos bons momentos e aturado nos maus.

E, *last but certainly not least*, à Ana Rita Ferrão, pela enorme paciência e por ter estado sempre presente.

E a todos, desculpem lá qualquer coisinha.

Resumo

Desenvolvimento de métodos moleculares para detecção de *Trypanosoma* spp. em glossinas (Diptera: Glossinidae) da República da Guiné-Bissau

Carlos André Filipe da Silva Nazário

As moscas do género *Glossina* são vetores de patologias provocadas por várias espécies de parasita do género *Trypanosoma*, como a Tripanossomose Humana Africana e as Tripanossomoses Animais. A correta identificação destes tripanossomas é um ponto fulcral quando se procura determinar o risco de doença que determinadas populações de glossinas podem provocar.

No presente trabalho foram utilizadas e adaptadas diversas metodologias de diagnóstico molecular, nomeadamente o PCR em tempo real e o PCR-RFLP, que permitiram, através da utilização de *primers* genéricos, a determinação da carga parasitária e a correta identificação dos tripanossomas presentes no vetor. Os *primers* denominados Tryp18SF e Tryp18SR foram desenvolvidos especificamente para serem utilizados na identificação das espécies de tripanossoma utilizando PCR em tempo real com metodologia SYBR® *Green I* e PCR-RFLP. Os *primers* denominados Tryp18S2F, Tryp18S2R e sonda Tryp18S2P foram desenvolvidos para a quantificação dos parasitas presentes nas amostras utilizando PCR em tempo real com metodologia Taqman®.

Foi estudada uma amostra de 762 glossinas provenientes do território da República da Guiné-Bissau, zona atualmente considerada como estando livre de Tripanossomose Humana Africana, mas onde não são realizadas atividades de recenseamento de casos desde o final da ocupação portuguesa.

Das 762 glossinas utilizadas, 241 estavam infetadas com tripanossomas, o que representa uma percentagem de infeção geral de 31,6 %. Destas glossinas, 28.63 % encontravam-se infetadas com *Trypanosoma grayi*, 14.11 % com *Trypanosoma congolense*, 7.05 % com *Trypanosoma vivax* e 0.83 % com *Trypanosoma brucei brucei*, tendo as infeções mistas representado 1.66 %. Não foi possível a identificação conclusiva ao nível da espécie em 48.13 % das amostras positivas, tendo estas ficado consideradas como *Trypanosoma* spp. Não foram identificados vetores infetados com tripanossomas responsáveis pelas patologias humanas.

A utilização de *primers* genéricos para a identificação permitiu obviar o número de reações necessárias para identificar corretamente o parasita responsável pela infeção, e este trabalho é de resto a primeira descrição da utilização de *primers* genéricos que permitam a identificação de *Trypanosoma grayi*.

Esta é também a primeira descrição da utilização de PCR em tempo real com metodologia Taqman® para quantificação de tripanossomas, e a sua utilização com *primers* genéricos aumenta a aplicabilidade em estudos epidemiológicos de grande escala.

Palavras-chave: PCR em tempo real; PCR-RFLP; República da Guiné-Bissau; *Glossina*; *Trypanosoma*; Tripanossomose.

Abstract

Development of molecular methods for the detection of *Trypanosoma* spp. in glossina flies (Diptera: Glossinidae) from the Republic of Guinea-Bissau

Carlos André Filipe da Silva Nazário

Flies of the genus *Glossina* are vectors of Human African Trypanosomosis and Animal Trypanosomosis, diseases which are caused by various parasites of the genus *Trypanosoma*. Correct identification of trypanosomes is essential to assess the disease risk posed by certain *Glossina* populations.

Several molecular diagnosis methodologies were applied and adapted in the present work, namely real time PCR and PCR-RFLP, which allowed, through the use of generic primers, to determine the parasite load and the correct identification of the trypanosomes present in the vector. One pair of primers, named Tryp18SF and Tryp18SR, were specifically designed for the identification of trypanosome species using real time PCR with SYBR® Green I methodology and PCR-RFLP. Another pair of primers, named Tryp18S2F, Tryp18S2R, along with the probe Tryp18S2P, was designed for the quantification of parasites present in the samples using real time PCR with Taqman® probe methodology.

A sample consisting of 762 flies of the genus *Glossina* captured in the Republic of Guinea-Bissau was studied. This territory is currently listed as being free of Human African Trypanosomosis, but no large-scale epidemiologic surveys regarding the disease have been made since the end of the Portuguese occupation.

Of the 762 studied flies, 241 were infected with trypanosomes, which represents an overall infection percentage of 31.6 %. Of these flies, 28.63 % were infected with *Trypanosoma grayi*, 14.11 % with *Trypanosoma congolense*, 7.05 % with *Trypanosoma vivax* and 0.83 % with *Trypanosoma brucei brucei*, whereas mixed infections represented 1.66 %. No conclusive identification at the species level was possible in 48.13 % of the positive samples, and so these parasites were considered to be *Trypanosoma* spp. Vectors infected with trypanosomes responsible for human diseases were not found.

The use of generic primers for identification purposes allowed us to reduce the number of reactions needed to perform a correct identification of the parasite responsible for the infection, and this work is the first to use generic primers that allow the identification of *Trypanosoma grayi*.

This is also the first work to use real time PCR with Taqman® probe methodology for the quantification of trypanosomes, and the use of generic primers will greatly improve its applicability to large-scale epidemiological surveys.

Keywords: Real time PCR; PCR-RFLP; Republic of Guinea-Bissau; *Glossina*; *Trypanosoma*; Trypanosomosis.

Índice Geral

1 – Introdução	1
1.1 – O parasita.....	2
1.1.1 – Classificação taxonómica.....	2
1.1.1.1 – Taxonomia do género <i>Trypanosoma</i>	2
1.1.1.2 – Classificação sub-genérica e espécies de <i>Trypanosoma</i>	3
1.1.2 – Estádios parasitários.....	5
1.1.2.1 – Estádio de epimastigota	5
1.1.2.2 - Estádio de tripomastigota	5
1.1.3 – Estrutura celular	6
1.2 – O Vetor	7
1.2.1 – Classificação taxonómica.....	7
1.2.1.1 – Taxonomia do género <i>Glossina</i> Wiedemann, 1830	7
1.2.1.2 - Classificação sub-genérica e espécies de <i>Glossina</i>	7
1.2.2 – Características morfológicas	8
1.2.2.1 – Principais características morfológicas externas.....	8
1.2.2.2 – Características morfológicas externas únicas	9
1.2.2.3 - Características morfológicas internas – sistema digestivo	10
1.2.3 - Biologia.....	11
1.2.3.1 – Ciclo de vida do vetor	11
1.2.3.2 – Ciclo do parasita no vetor	11

1.2.3.3 – Organismos simbiotes	13
1.2.4 – Ecologia	13
1.2.4.1 – Distribuição geográfica	13
1.2.4.2 – Hospedeiros naturais grupo <i>Palpalis</i>	15
1.3 – As doenças.....	16
1.3.1 – Tripanossomose Humana Africana.....	16
1.3.1.1 – THA no século XX	16
1.3.1.2 – Distribuição geográfica	17
1.3.1.3 – Epidemiologia	18
1.3.1.4 – Ciclo de transmissão	19
1.3.1.5 – Sinais e sintomas clínicos	20
1.3.1.6 – Diagnóstico	21
1.3.1.7 – Tratamento	22
1.3.2 – Tripanossomose Animal	22
1.3.2.1 – Descrição geral.....	22
1.3.2.2 – Importância socioeconómica.....	23
1.4 – República da Guiné-Bissau	24
1.4.1 – Características gerais.....	24
1.4.1.1 - Geografia	24
1.4.1.2 – Aspetos sócio-demográficos	24
1.4.2 – Revisão histórica de THA na RGB	24
1.4.2.1 - Introdução	24
1.4.2.2 – Prevalência patologia	25
1.4.2.3 – Capturas e grau de infestação de <i>Glossina</i>	26
1.4.3 – Situação atual de THA na RGB	26

1.4.3.1 - Prevalência patologia.....	26
1.4.3.2 - Capturas e grau de infestação de <i>Glossina</i>	27
1.4.4 – Tripanossomose animal na RGB.....	27
1.5 – Métodos de Biologia Molecular	28
1.5.1 – Reação em cadeia da polimerase	28
1.5.1.1 – Introdução	28
1.5.1.2 – Estudos relevantes efetuados com recurso ao método	28
1.5.2 – PCR em tempo real	31
1.5.2.1 – Introdução	31
1.5.2.2 – Estudos relevantes efetuados com recurso ao método	34
1.5.3 – Enzimas de restrição	35
1.5.3.1 – Introdução	35
1.5.3.2 – Estudos relevantes efetuados com recurso ao método	35
1.5.4 - Sequenciação	36
1.6 – Objetivos	37
2 – Materiais e Métodos.....	38
2.1 – Caracterização da amostra.....	39
2.1.1 – Obtenção das glossinas	39
2.1.2 – Seleção das glossinas	39
2.2 – Corte das glossinas	43
2.3 – Extração de ADN	45
2.4 – Determinação da concentração de ADN extraído	45
2.5 – <i>Primers</i> utilizados e condições de PCR	46

2.5.1 – PCR convencional.....	46
2.5.1.1 – Pontos comuns a todas as reações de PCR convencional	46
2.5.1.2 – <i>Primers</i> GmTub	47
2.5.1.3 – <i>Primers</i> Tb177	47
2.5.1.4 – <i>Primers</i> TgsGP (PCR <i>nested</i>)	48
2.5.1.5 – <i>Primers</i> MC.....	48
2.5.2 – PCR em tempo real	49
2.5.2.1 – Pontos comuns a todas as reações de PCR em tempo real.....	49
2.5.2.2 – <i>Primers</i> Tryp18S.....	49
2.5.2.3 – <i>Primers</i> Tryp18S2.....	50
2.5.3 - Desenvolvimento dos <i>primers in-house</i>	51
2.5.3.1 – Sequências de ADN	51
2.5.3.2 – Características funcionais dos <i>primers</i>	51
2.5.3.3 – Temperaturas de dissociação	52
2.6 – Utilização de enzima de restrição.....	53
2.6.1 – PCR convencional.....	53
2.6.1.1 – <i>Primers</i> Tryp18S.....	53
2.6.2 – Restrição.....	53
2.6.2.1 – Enzima de restrição	53
2.6.2.2 – Reação	54
2.6.2.3 – Perfil de restrição esperado	54
2.7 – Recurso a sequenciação de ADN	55
2.7.1 – PCR convencional.....	55
2.7.1.1 – <i>Primers</i> Tryp18S.....	55
2.7.2 - Reação.....	55

2.7.2.1 – Purificação do ADN obtido.....	55
2.7.2.2 – Sequenciação propriamente dita	55
2.8 – Análise estatística	55
2.8.1 – Relação entre número de moscas infetadas e o sexo das moscas ...	55
2.8.2 – Relação entre a carga parasitária média e o sexo das moscas.....	56
3 – Resultados	57
3.1 – Extração de ADN	58
3.2 – Determinação da concentração de ADN extraído	58
3.3 – Preparação da solução-padrão de ADN para as reações de PCR em tempo real	58
3.4 – PCR em tempo real	59
3.4.1 – Desenvolvimento de PCR em tempo real para quantificação de ADN de <i>Trypanosoma</i> em <i>Glossina</i>	59
3.4.1.1 – Sensibilidade dos <i>primers</i> Tryp18S2	61
3.4.1.2 – Especificidade dos <i>primers</i> Tryp18S2	62
3.4.1.3 – Estudo de variabilidade intra-ensaio dos <i>primers</i> Tryp18S2 ...	63
3.4.1.4 – Estudo da variabilidade inter-ensaio dos <i>primers</i> Tryp18S2 ...	64
3.4.2 – Desenvolvimento de PCR em tempo real para identificação de espécies de <i>Trypanosoma</i>	64
3.4.2.1 – Determinação das temperaturas de dissociação específicas	64
3.4.2.2 – Identificação de produtos inespecíficos	66
3.5 – PCR-RFLP	67
3.5.1 – Desenvolvimento de método PCR-RFLP para identificação de espécies de <i>Trypanosoma</i>	67

3.5.1.1 – Local de corte da enzima de restrição	67
3.5.1.2 – Sensibilidade da técnica PCR-RFLP	69
3.5.1.3 – Perfil de restrição em gel de agarose	69
3.5.1.4 – Avaliação da possibilidade de infecção cruzada com <i>Leishmania</i> spp.	71
3.6 – Aplicação à amostra em estudo	73
3.6.1 – Infecção de <i>Glossina palpalis gambiensis</i> na RGB	73
3.6.1.1 – Número de glossinas infetadas	73
3.6.1.2 – Número de glossinas infetadas, por sexo	73
3.6.1.3 – Carga parasitária média, por sexo do vetor	74
3.6.1.4 – Número de glossinas infetadas, de ambos os sexos, por espécie de tripanossoma	75
3.6.2 – Identificação de espécies de <i>Trypanosoma</i>	76
3.6.2.1 – Identificação preliminar por PCR em tempo real, SYBR® Green I	76
3.6.2.2 – Identificação conclusiva após PCR-RFLP	78
3.6.2.3 – Confirmação da identificação de amostras por sequenciação ..	80
3.6.2.4 – Confirmação da infecção por <i>T. brucei</i> s.l.	81
3.6.2.5 – Resultados da identificação, por região da RGB	82
3.6.2.6 – Resultados da identificação, por espécie de tripanossoma	85
4 – Discussão e Conclusão	86
4.1 – Discussão	87
4.1.1 – Quantificação de ADN de <i>Trypanosoma</i> por PCR em tempo real .	87
4.1.2 – Identificação das espécies de <i>Trypanosoma</i>	93

4.1.3 – Aplicação das técnicas à amostra em estudo	95
4.2 – Conclusão	101
Referências bibliográficas	103
Lista de Figuras	112
Lista de Tabelas	113
Lista de Gráficos	114
Lista de Equações.....	115
Anexos	116

Lista de Abreviaturas

A – Adenina

ADN – Ácido desoxirribonucleico

ARN – Ácido ribonucleico

C – Citosina

CATT – *Card Agglutination Test for Trypanosomiasis*

Ct – *Cycle threshold*

DNA – *Deoxyribonucleic acid*

ELISA – *Enzyme Linked ImmunoSorbent Assay*

e.p. – equivalentes de parasita

FAM – 6-carboxi-fluoresceína

G - Guanina

IHMT – Instituto de Higiene e Medicina Tropical

ITS1 – *Internal Transcribed Spacer 1*

kDNA – Ácido desoxirribonucleico cinetoplastideal

LCR – Líquido cefalorraquidiano

NCBI – *National Center for Biotechnology Information*

NECT – *Nifurtimox Eflornithine Combination Treatment*

OMS – Organização Mundial de Saúde

PAGE – *Polyacrylamide Gel Electrophoresis*

p.b. – pares de bases

PCR – *Polymerase Chain Reaction*

PCR-RFLP – *Polymerase Chain Reaction Restriction Fragment Length Polymorphism*

RGB – República da Guiné-Bissau

SNC – Sistema Nervoso Central

SRA – *Serum Resistance Antigen*

SUG – Subunidade grande

SUP – Subunidade pequena

T – Timina

TAMRA – 6-carboxi-tetrametil-rodamina

Taq – *Thermus aquaticus*

TgsGP - *Trypanosoma brucei gambiense specific glycoprotein*

THA – Tripanossomose Humana Africana

W – Adenina ou Timina

WHO – *World Health Organization*

1 – Introdução

As tripanossomoses são patologias que afetam tanto seres humanos como animais, causadas por parasitas pertencentes ao género *Trypanosoma* spp. O ciclo de transmissão destes parasitas implica a sua passagem através de um vetor, nomeadamente moscas do género *Glossina*. As formas da patologia que afetam humanos são conhecidas em conjunto como Tripanossomose Humana Africana, e as que afetam animais são conhecidas como Tripanossomoses Animais.

Historicamente, na República da Guiné-Bissau, tanto a Tripanossomose Humana Africana como as Tripanossomoses Animais eram patologias de grande expressão, e com consequências graves ao nível da saúde das populações e também ao nível socio-económico. Hoje em dia, considera-se que este país se encontra livre da vertente humana da patologia, mas pensa-se que exista uma subavaliação do número de casos, uma vez que não é efetuado nenhum rastreio epidemiológico da patologia desde que o país se tornou independente.

1.1 – O parasita

1.1.1 – Classificação taxonómica

1.1.1.1 – Taxonomia do género *Trypanosoma*

Até recentemente, a classificação taxonómica para os tripanossomas proposta pela Sociedade de Protozoologistas (Levine et al. 1980), e adotada pela Organização Mundial de Saúde (OMS) (WHO 1986), era a exposta na tabela apresentada na página seguinte (**Tabela 1**).

Esta classificação, apesar de ser a mais utilizada, já foi alvo de uma atualização (Adl et al. 2005). Este novo documento propõe algumas mudanças, como o abandono de alguns grupos considerados tradicionais (como Mastigophora, p.e.), e a utilização de dados de morfologia, bioquímica e filogenética molecular recentes para criar um modelo mais abrangente e correto que o anterior. Outra particularidade deste modelo é a não utilização das designações formais de hierarquia (como “Classe” e “Sub-Ordem”, etc.), optando por organizar os eucariotas em seis super-grupos, sendo que as consequentes divisões são apresentadas como diferentes graus na hierarquia (1º grau, 2º grau, etc.).

Tabela 1 - Classificação do género *Trypanosoma* (adaptado de WHO, 1986)

Reino	PROTISTA
Sub-Reino	PROTOZOA
Filo	SARCOMASTIGOPHORA
Sub-Filo	MASTIGOPHORA
Classe	ZOOMASTIGOPHORAE
Ordem	KINETOPLASTIDA
Sub-Ordem	TRIPANOSOMATINA
Família	TRYPANOSOMATIDAE
Género	<i>Trypanosoma</i>

Assim, a nova designação completa para este género será *Trypanosoma* [Excavata: Euglenozoa: Kinetoplastea: Metakinetoplastina: Tripanosomatida] (Adl et al. 2005). Contudo, no âmbito deste trabalho, quando se quiser fazer referência a este género utilizar-se-á apenas *Trypanosoma* spp.

Todos os géneros englobados no grupo Tripanosomatida apresentam as seguintes características (Adl et al. 2005): 1) eucinetoplastos com uma rede de ácido desoxirribonucleico cinetoplastideal (kDNA); 2) uniflagelados com o flagelo a emergir da bolsa anterior, ou a emergir lateralmente e ligado ao corpo; 3) fagotróficos ou osmotróficos; 4) citostoma, quando presente, simples e próximo da bolsa flagelar; 5) exclusivamente parasitários.

1.1.1.2 – Classificação sub-genérica e espécies de *Trypanosoma*

O género *Trypanosoma* encontra-se dividido em dois grandes grupos: Stercoraria e Salivaria. Esta designação encontra justificação no ciclo de vida do parasita no vetor, consoante as formas metacíclicas (infetantes) se desenvolvam nas glândulas salivares do vetor ou no seu intestino (Baral 2010).

O grupo Stercoraria engloba três sub-géneros, *Herpetosoma*, *Megatrypanum* e *Schizotrypanum* (Hoare 1972), sendo que apenas neste último subgénero se encontra uma espécie patológica para o Homem, o *Trypanosoma cruzi*, responsável pela doença

de Chagas (WHO 2010b). Os restantes sub-gêneros contêm espécies parasitas de outros animais, como *Trypanosoma (Herpetosoma) lewisi*, que infeta ratos, e *Trypanosoma (Megatrypanum) theileri*, que infeta gado bovino (Atouguia 1998).

O grupo Salivaria engloba quatro sub-gêneros, *Duttonella*, *Nannomonas*, *Trypanozoon* e *Pycnomonas* (Hoare 1972). Destes, apresenta particular importância para a saúde humana o sub-gênero *Trypanozoon*, porque nele estão englobados os parasitas responsáveis pela Tripanossomose Humana Africana (THA), uma patologia fatal se não for tratada que, apesar de apresentar um número atual de casos aparentemente negligenciável à escala mundial (50.000 a 70.000), representa, pelas características próprias da distribuição focal e pela população afetada, um grave problema de saúde pública com repercussões importantes a nível socioeconómico (Brun et al. 2010).

Os microorganismos responsáveis pelas duas apresentações desta patologia são *Trypanosoma brucei gambiense* e *Trypanosoma brucei rhodesiense* (Smith et al. 1998). Uma apresentação mais aprofundada desta patologia será feita mais à frente neste trabalho.

O mesmo sub-gênero engloba ainda as espécies *Trypanosoma evansi* e *Trypanosoma equiperdum*, que são responsáveis por patologias veterinárias, afetando cavalos e camelos (Cordon-Obras et al. 2010). Os restantes sub-gêneros do grupo Salivaria apresentam também importância veterinária, como por exemplo *Trypanosoma (Duttonella) vivax*, que infeta um grande número de espécies de animais domésticos, *Trypanosoma (Nannomonas) congolense*, responsável por uma grave patologia que afeta gado bovino, caprino, ovino, equino e camelos, e *Trypanosoma (Pycnomonas) suis*, que afeta gado porcino (Atouguia 1998). Importa referir que a inclusão do sub-gênero *Pycnomonas* se faz para que haja uma representação completa dos sub-gêneros constantes do grupo Salivaria, muito embora não existam isolados deste tripanossoma, e não tenha sido apresentado um registo concreto deste parasita há mais de 50 anos (Gibson 2007).

1.1.2 – Estádios parasitários

Ao longo dos seus ciclos de vida, os tripanossomas apresentam diversas morfologias, que lhes conferem uma maior adaptabilidade ao meio, seja no hospedeiro ou no vetor (Vickerman et al. 1988). Os géneros pertencentes ao grupo *Trypanosomatida* (Adl et al. 2005) apresentam, no geral, seis morfologias-tipo, a saber: tripomastigota, epimastigota, amastigota, opistomastigota, promastigota e coanomastigota (Sharma et al. 2009). Contudo, no âmbito desta tese, apenas se vão descrever as características das formas tripomastigota e epimastigota, porque são as duas formas que os tripanossomas responsáveis pela THA apresentam ao longo do seu ciclo de vida (Stuart et al. 2008).

1.1.2.1 – Estadio de epimastigota

Esta é a morfologia que os tripanossomas africanos apresentam no inseto vetor. Os parasitas deste estadio são mais esguios (daí serem usualmente chamados de *slender*) que os das restantes formas, apresentam um núcleo central, o cinetoplasto anterior ao núcleo e o flagelo a emergir no bordo de uma membrana ondulante, desde a bolsa flagelar até à região anterior do parasita, onde fica livre. Esta forma não é infetante para o homem, mas tem capacidade para se desenvolver para a forma metacíclica infetante dentro do inseto vetor (Stuart et al. 2008).

1.1.2.2 - Estadio de tripomastigota

Esta é a morfologia que os parasitas apresentam quando se encontram no hospedeiro vertebrado. Os tripanossomas neste estadio são igualmente esguios e apresentam um núcleo central, tal como no estadio de epimastigota, mas neste caso o cinetoplasto é posterior ao núcleo, sub-terminal, podendo ou não existir uma porção livre do flagelo, consoante a espécie (Stuart et al. 2008). A partir desta forma desenvolve-se a forma *short stumpy* (pequena e atarracada), que apresenta as mesmas características, mas é mais pequena e larga, e tem a particularidade de ser a única forma infetante para o vetor (Hoare 1972).

A figura seguinte (**Figura 1**) é uma representação gráfica dos dois estadios morfológicos aqui descritos.

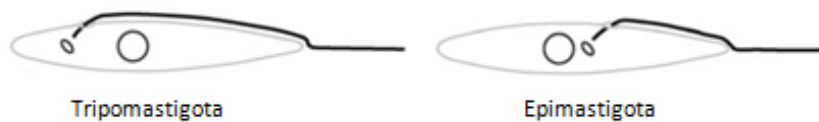


Figura 1- Representação gráfica da morfologia de tripomastigota e de epimastigota. Adaptado de (Sharma et al. 2009)

1.1.3 – Estrutura celular

Os tripanossomas são eucariotas, e portanto apresentam as características usuais comuns a todas as células eucariotas, como a presença de um núcleo delimitado por uma membrana nuclear e organelos como retículo endoplasmático, complexo de Golgi, mitocôndria, etc (Baral 2010). Contudo, alguns destes organelos apresentam algumas características que espelham adaptações a um ciclo de vida que ocorre em dois organismos diferentes (vetor e hospedeiro). Entre estas incluem-se a presença de um cinetoplasto, flagelo e bolsa flagelar, uma membrana celular envolvida em processos de evasão à resposta imune, glicossomas e mecanismos de edição de ácido ribonucleico (ARN).

1.2 – O Vetor

1.2.1 – Classificação taxonómica

1.2.1.1 – Taxonomia do género *Glossina* Wiedemann, 1830

A classificação taxonómica das moscas do género *Glossina* Wiedemann 1830 está representada na **Tabela 2**.

Tabela 2 - Classificação sistemática do género *Glossina* Wiedemann 1830

Reino	ANIMALIA
Filo	ARTHROPODA
Subfilo	MANDIBULATA
Classe	INSECTA
Subclasse	PTERYGOTA
Divisão	ENDOPTERYGOTA (HOLOMETABULA)
Ordem	DIPTERA
Subordem	BRACHYCERA
Infraordem	CYCLORRAPHIA (MUSCOMORPHA)
Secção	SCHIZOPHORA
Subsecção	CALIPTERATA (THECOSTOMATA)
Superfamília	HIPPOBOSCOIDAE
Família	GLOSSINIDAE
Género	<i>Glossina</i>

A família Glossinidae é monogénica, e está incluída na superfamília Hippoboscoidae, sendo que todos os membros deste grupo são exclusivamente hematófagos, e reproduzem-se por viviparidade adenotrófica (Krafsur 2009).

1.2.1.2 - Classificação sub-genérica e espécies de *Glossina*

As diferentes espécies de *Glossina* encontram-se organizadas em três sub-géneros, *Austenina* Townsend, *Nemorhina* Robineau-Desvoidy e *Glossina* Wiedemann,

que correspondem aos grupos de espécies *Fusca*, *Palpalis* e *Morsitans*, respetivamente. Um outro sub-género, *Machadomia* Dias, foi criado para incorporar a *Glossina* anómala *G. austeni* Newstead (Krafsur 2009). A **Tabela 3** apresenta as espécies e subespécies que fazem parte destes grupos.

Tabela 3 - Espécies e subespécies de *Glossina*, consoante o subgénero (grupo)
Adaptado de (Leak, 1999)

<i>Austenina (Fusca)</i>	<i>Nemorhina (Palpalis)</i>	<i>Glossina (Morsitans)</i>	<i>Machadomia</i>
<i>G. fusca fusca</i>	<i>G. palpalis palpalis</i> *	<i>G. morsitans submorsitans</i>	<i>G. austeni</i>
<i>G. nigrofusca nigrofusca</i>	<i>G. palpalis gambiensis</i> *	<i>G. morsitans centralis</i> *	
<i>G. nigrofusca hopkinsi</i>	<i>G. fuscipes fuscipes</i> *	<i>G. morsitans morsitans</i> *	
<i>G. medicorum</i>	<i>G. fuscipes quanzensis</i> *	<i>G. longipalpis</i>	
<i>G. tabaniformis</i>	<i>G. fuscipes martinii</i> *	<i>G. pallidipes</i> *	
<i>G. brevipalpis</i>	<i>G. tachinoides</i> *	<i>G. swynnertoni</i> *	
<i>G. longipennis</i>	<i>G. pallicera pallicera</i>		
<i>G. frezili</i>	<i>G. pallicera</i>		
<i>G. severini</i>	<i>G. caliginea</i>		
<i>G. haningtoni</i>			
<i>G. fuscipleuris</i>			
<i>G. vanhoofi</i>			

*Espécies passíveis de transmitir o parasita responsável pela Tripanossomose Humana Africana (Covell 1955) e (Burri & Brun 2009)

1.2.2 – Características morfológicas

Neste trabalho não se vai efetuar uma descrição aprofundada das morfologias interna e externa de *Glossina*, sendo que para tal se aconselhe a consulta da obra de Mulligan (Mulligan & Potts 1970) ou de Leak (Leak 1999). Apresentam-se, contudo, algumas características morfológicas básicas, minimamente necessárias à realização deste trabalho.

1.2.2.1 – Principais características morfológicas externas

O corpo das moscas adultas do género *Glossina* está dividido em três partes: a cabeça, o tórax e o abdómen.

A cabeça apresenta um par de olhos compostos, e um par de antenas, inseridas em pequenas depressões entre os olhos compostos. O probóscis (armadura bucal) está situado na base da cabeça, e é constituído por três peças anatómicas distintas: o lábio, o labro e a hipofaringe. O lábio é considerado o verdadeiro órgão picador, apresentando na sua extremidade distal bilobada fortes dentículos que permitem a picada. O labro é o órgão através do qual a glossina aspira o sangue durante a refeição sanguínea, prolongando-se internamente para a faringe. A hipofaringe é uma estrutura tubular, que permite a saída da saliva quando o inseto pica o hospedeiro e que comunica internamente com o canal salivar comum (Hoare 1972).

O tórax é a estrutura anatómica onde estão fixadas as asas (um par), os balanceiros (ou halteres), as patas (três pares) e os espiráculos (dois pares) (Badjana 2004).

O abdómen é constituído por oito segmentos, e tem ao longo do seu comprimento, lateralmente, sete pares de espiráculos. Ventralmente, apresenta a genitália, tanto a feminina como a masculina, que é um dos fatores determinantes para a definição da espécie a que a *Glossina* em estudo pertence (Badjana 2004).

1.2.2.2 – Características morfológicas externas únicas

Existem algumas características que vale a pena evidenciar, porque são características exclusivas de *Glossina*, auxiliando na diferenciação entre as glossinas adultas e outros tipos de mosca. São elas:

Probóscis: a probóscis das glossinas é diferente das restantes moscas porque se encontra numa posição paralela ao chão, apenas ficando na perpendicular quando a mosca está a alimentar-se, sendo que os palpos maxilares se mantêm na mesma posição (Covell 1955).

Nervura das asas: o padrão de nervura das asas de glossina é característico, porque a célula central apresenta uma forma semelhante ao desenho de um machado (Covell 1955).

Posição das asas em repouso: quando a glossina se encontra pousada, posiciona as asas de modo a ficarem cruzadas, uma por cima da outra, ao longo de todo o

comprimento do corpo e para lá deste, fazendo coincidir os dois ápices alares (Badjana 2004).

1.2.2.3 - Características morfológicas internas – sistema digestivo

Para uma compreensão facilitada do papel desempenhado pelas glossinas enquanto vetores de patologias provocadas por tripanossomas, apresenta-se uma descrição simples das principais estruturas do sistema digestivo, uma vez que é por onde os parasitas entram no vetor, se desenvolvem, e por onde voltam a sair.

O aparelho digestivo das glossinas está organizado em três partes: o intestino anterior (*foregut*), o intestino médio (*midgut*) e o intestino posterior (*hindgut*).

Quando efetua a ingestão de sangue, o mesmo passa através do labro para a faringe (ou bomba cibarial) e esôfago, que depois abre para o intestino médio e para o divertículo esofágico (Hoare 1972). Ao conjunto das três primeiras estruturas dá-se o nome de intestino anterior (Badjana 2004). O divertículo esofágico está assim ligado por um canal à interseção entre o esôfago e o intestino médio. O sangue é aspirado durante a alimentação, e enviado para o divertículo esofágico, sendo depois progressivamente transferido para o intestino médio.

A região anterior do intestino médio apresenta uma dilatação, a cárdia (também chamada de proventrículo), que desempenha funções tanto ao nível da formação da membrana peritrófica como servindo de barreira, com capacidades de resposta imune, à entrada de microorganismos patogênicos no intestino médio das glossinas. As glossinas são naturalmente refratárias à infecção por tripanossomas, e a função desempenhada pela membrana peritrófica constitui um dos fatores que o possibilitam (Hao et al. 2003). O intestino médio é formado por um longo tubo, envolvido pela membrana peritrófica, formando assim o espaço endoperitrófico e o espaço ectoperitrófico. Esta distinção é importante não só a nível anatómico, mas também porque a passagem do espaço endoperitrófico para o espaço ectoperitrófico representa um ponto fulcral no desenvolvimento de *T. brucei sensu lato* dentro da glossina (Sharma et al. 2009). É no intestino médio que se dá a digestão da refeição sanguínea (Hoare 1972).

O intestino posterior encontra-se no seguimento do intestino médio, iniciando-se ao nível dos túbulos de Malpighi (órgão excretor), passando pelo reto e terminando no ânus (Hoare 1972).

1.2.3 - Biologia

1.2.3.1 – Ciclo de vida do vetor

Como já foi indicado anteriormente (ver **1.2.1.1**), as glossinas reproduzem-se por viviparidade adenotrófica.

Isto significa que uma fêmea adulta é inseminada e o zigoto desenvolve-se até formar um ovo, que eclode ainda no interior do sistema reprodutivo da mãe, dando início ao desenvolvimento larvar (Aksoy & Rio, 2005), um processo dependente da temperatura. Depois da postura, a larva totalmente desenvolvida penetra no solo, onde progride para o estado pupal, e emerge uma mosca adulta aproximadamente um mês depois (Brun et al., 2010). Este processo também é dependente da temperatura, sendo que o desenvolvimento pupal não é bem sucedido abaixo dos 17°C nem acima dos 32°C (Kuzoe & Schofield 2004).

As fêmeas copulam apenas uma vez durante a sua vida, que tem uma duração média entre 2 e 3 meses, e são capazes de formar uma nova larva de 10 em 10 dias, o que significa que geram aproximadamente 12 descendentes (Kuzoe & Schofield 2004).

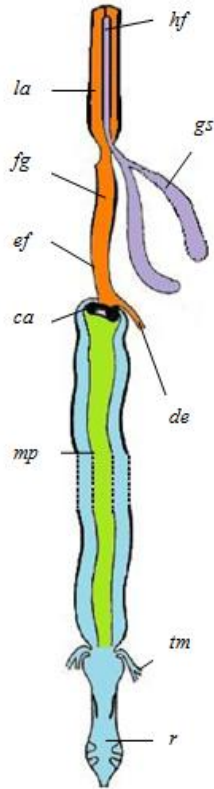
1.2.3.2 – Ciclo do parasita no vetor

Diferentes espécies de tripanossoma apresentam diferentes tipos de ciclo no vetor.

A **Tabela 4**, apresentada na página seguinte, é representativa das estratégias de desenvolvimento no vetor de diferentes espécies de tripanossoma. Nela estão indicados os locais anatómicos onde é possível encontrar os parasitas no estadio inicial da infeção (após ingestão sanguínea) e o estadio final da infeção (onde se desenvolvem as formas infetantes).

Tabela 4 - Regiões anatômicas do sistema digestivo de *Glossina* envolvidas no desenvolvimento de diferentes espécies de tripanossomas

Região anatômica	Estadio inicial da infecção	Estadio final da infecção
Probóscis	<i>T. vivax</i>	<i>T. vivax</i> <i>T. congolense</i>
Glândulas salivares	-	<i>T. brucei brucei</i> <i>T. brucei gambiense</i> <i>T. brucei rhodesiense</i>
Intestino médio	<i>T. congolense</i> <i>T. brucei brucei</i> <i>T. brucei gambiense</i> <i>T. brucei rhodesiense</i> <i>T. grayi</i>	-
Intestino posterior	-	<i>T. grayi</i>



Legenda: *ca* – cárdia; *de* – divertículo esofágico; *ef* – esófago; *fg* – faringe; *gs* – glândulas salivares; *hf* – hipofaringe; *la* – labro; *mp* – membrana peritrófica; *r* – reto; *tm* – túbulos de Malpighi. Dados de (Roditi & Lehane 2008) e (Adams et al. 2010). Imagem adaptada de (Hoare 1972).

Como é possível ver, numa fase inicial a maior parte das espécies de tripanossoma migra até ao intestino médio, onde alguns sofrem alterações morfológicas que lhes permitem migrar para outro órgão. A exceção a isto é o *T. vivax*, que faz todo o ciclo no vetor na região da probóscis (Adams et al. 2010). Após algumas fases de maturação (número dependente da espécie em causa), os tripanossomas migram então para regiões que lhes permitam desenvolver formas infetantes, bem como ser transmitidos aos diversos hospedeiros. Os parasitas que apresentam um modo de desenvolvimento do tipo *Salivaria* dirigem-se para a zona do aparelho bucal, de modo a poderem ser transmitidos numa eventual picada infetante. Contudo, algumas espécies, como *T. congolense* e *T. simiae* migram para a probóscis, enquanto que a infestação das

glândulas salivares é, como já havia sido indicado, exclusiva de *T. brucei sensu lato* (Adams et al. 2010). Por sua vez, os parasitas da espécie *T. grayi* apresentam um modo de transmissão *Stercoraria*, pelo que desenvolvem as suas formas infetantes na região retal (Stevens et al. 1999).

1.2.3.3 – Organismos simbiotes

Alguns insetos devem o seu sucesso ecológico a associações simbióticas que estabelecem com microorganismos que têm capacidade de lhes fornecer nutrientes que não se encontram na sua alimentação regular, ou que simplesmente não são sintetizados pelos hospedeiros. As glossinas são um exemplo disto mesmo, uma vez que se alimentam exclusivamente de sangue (Aksoy & Rio 2005).

As glossinas podem ter até três espécies de microorganismos simbiotes diferentes, a saber: *Wigglesworthia glossinidia*, *Sodalis glossinidius* e género *Wolbachia*. De um modo geral, é difícil estabelecer ao certo a função que cada um deles desempenha, uma vez que a sua cultura *in vitro* é dificultada pelo facto de alguns serem simbiotes obrigatórios. Assim, grande parte dos estudos têm sido desenvolvidos através da eliminação desses microorganismos, e tentando estabelecer a sua função nas mudanças observadas na biologia das moscas (Aksoy et al. 2001). Por exemplo, estudos em que se realiza a administração de antibióticos, lisozima e anticorpos específicos resultam num atraso no crescimento da mosca e numa diminuição da produção de ovos, interferindo assim na sua capacidade de reprodução. Esta diminuição pode ser revertida através da suplementação da alimentação sanguínea com vitaminas do complexo B, pelo que se pensa que algum dos microorganismos esteja envolvido na produção destes compostos (Aksoy et al. 2001).

1.2.4 – Ecologia

1.2.4.1 – Distribuição geográfica

As glossinas são moscas existentes exclusivamente em África (Atouguia 1998). Os limites da sua área de distribuição vão desde aproximadamente os 15° de latitude Norte aos cerca de 30° de latitude Sul, sendo que ocupam toda área de Este a Oeste de

África nestas latitudes. A **Figura 2** apresenta, à esquerda (**A**), o mapa da distribuição de glossinas de todas as espécies no continente africano.

Neste trabalho apenas se vão utilizar glossinas da sub-espécie *Glossina palpalis gambiensis*, pelo que apenas se vai descrever a distribuição geográfica e as características do *habitat* relativas ao subgénero a pertencem, *Nemorhina* (Grupo Palpalis). Para uma informação alargada aos restantes grupos, sugere-se a consulta da obra de Leak (Leak 1999).

A **Figura 2** apresenta, à direita (**B**), o mapa da distribuição de glossinas do grupo Palpalis no continente africano.

Como se pode ver, as glossinas deste grupo distribuem-se pela África Ocidental e Central. O clima, a distribuição de água, a vegetação e a presença e distribuição de humanos e hospedeiros animais são fatores importantes na definição desta distribuição (Leak 1999).

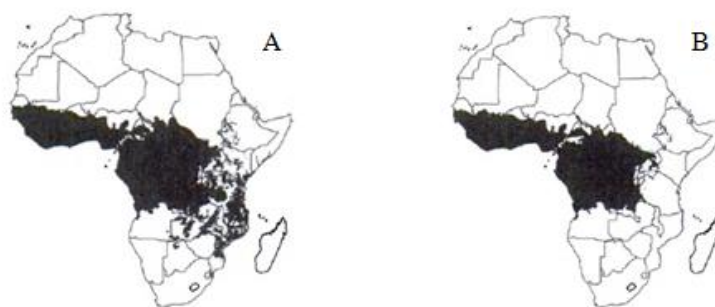


Figura 2 - Mapa da distribuição de *Glossina* no continente africano. Adaptado de (Leak 1999) A – Todas as espécies de *Glossina*; B – Apenas *Glossina* grupo *Palpalis*

Estas glossinas preferem um *habitat* de floresta tropical húmida, encontrando-se associadas a zonas de vegetação marginando rios, lagos, lagoas, pântanos e outros cursos de água. São consideradas espécies higrófilas, não pela necessidade direta de água, mas porque a proximidade da água lhes fornece humidade, vegetação densa para abrigo do sol e locais de larviposição, e alimentação que aí possam encontrar (Badjana 2004).

1.2.4.2 – Hospedeiros naturais grupo *Palpalis*

Existem dois grandes grupos de hospedeiros naturais de glossinas do grupo *Palpalis*, um formado pelos hospedeiros selvagens, e outro formado pelos animais domésticos, peridomésticos e humanos.

Como foi referido anteriormente (ver **1.2.4.1**), o grupo *Palpalis* tem preferência por vegetação nas margens de rios e de lagos. Por este motivo, têm associações ecológicas importantes com répteis como crocodilos e *Varanus*, que são hospedeiros importantes (Leak 1999). Outros animais selvagens importantes para glossinas deste grupo são os mamíferos, como bois, gazelas, hipopótamos e macacos, e as aves, principalmente as aquáticas (Challier, 1973; Ferreira, 1946).

Em relação ao grupo de animais peridomésticos, são considerados hospedeiros diversas espécies animais, como cavalos, porcos, gado bovino, caprino e ovino, o que acaba por influenciar grandemente a atividade pecuária e agricultura, e consequentemente o desempenho económico das regiões afetadas (Swallow 1999).

As glossinas pertencentes ao grupo *Palpalis* são ainda um vetor importante da THA do tipo gambiense (ver mais à frente neste trabalho).

1.3 – As doenças

1.3.1 – Tripanossomose Humana Africana

A THA, também conhecida por doença do sono, é uma patologia infecciosa, mortal se não tratada, causada pela infecção com um de dois parasitas, subespécies de *Trypanosoma brucei* (*T.b. gambiense* ou *T.b. rhodesiense*), e transmitida por vetores do género *Glossina*, que adquiriram a infecção através da picada de outros humanos infetados ou de animais hospedeiros (Burri & Brun 2009).

1.3.1.1 – THA no século XX

Durante o século XX, África foi palco de três grandes epidemias de THA.

A primeira epidemia ocorreu entre 1896 e 1906, afetando sobretudo os países Uganda e Congo, e provocando aproximadamente 300,000 a 500,000 mortes. Esta epidemia preocupou as autoridades coloniais, que decidiram enviar cientistas em missões com o objetivo de estudar a patologia e desenvolver uma cura (Steverding 2008). A segunda epidemia ocorreu entre os anos 20 e finais da década de 40, afetando um grande número de países. Esta epidemia foi combatida graças essencialmente a dois fatores: por um lado, à utilização dos medicamentos desenvolvidos desde a primeira epidemia, como suramina e triparsamida; por outro, o investimento das autoridades coloniais em controlo vetorial e na introdução de equipas móveis para deteção sistemática e ativa de casos, e consequente tratamento (Brun et al. 2010). Após o sucesso destas intervenções, nos finais da década de 60 a doença havia praticamente desaparecido. Contudo, a independência de muitas colónias, muitas vezes com conflitos civis, levou ao colapso das atividades de rastreio e controlo vetorial, e provocou uma reemergência progressiva da doença. Assim, foi desde o início da década de 70 que se assistiu à terceira epidemia de THA, com número de casos crescente que atingiu um pico em finais dos anos 90, com aproximadamente 40,000 casos reportados (WHO 2010a).

A **Figura 3**, na página seguinte, mostra a evolução do número de casos reportados e da população rastreada, entre 1939 e 1999.

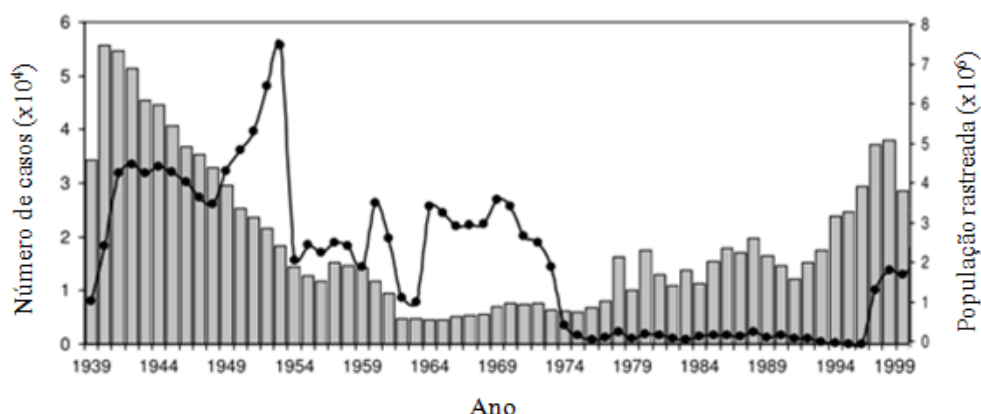


Figura 3 – Número de casos de TBA e população rastreada (1939-1999). Legenda: Colunas cinzentas – número de casos reportados; Círculos pretos, população rastreada.

1.3.1.2 – Distribuição geográfica

A distribuição geográfica da TBA está restringida à África Sub-Sahariana, onde existem *habitats* adequados à sobrevivência do seu vetor, *Glossina* (**Figura 2 (A)**). Nesta área estão incluídos 36 países onde, segundo a Organização Mundial de Saúde, é possível a transmissão de TBA (WHO 2010a). A prevalência não é, contudo, a mesma em todos os países, nem em todas as regiões dentro do mesmo país, uma vez que se trata de uma doença com uma distribuição focal (Burri & Brun 2009).

Os últimos dados relativos à incidência (dados de 2009) nos diferentes países são os seguintes (Simarro et al. 2011):

- > 1000 novos casos: República Democrática do Congo e República Centro-Africana;
- Entre 1000 e 100 novos casos: Angola, Chade, Sudão e Uganda;
- < 100 novos casos: Camarões, Congo, Costa do Marfim, Guiné Equatorial, Gabão, Guiné, Quênia, Malawi, Nigéria, República Unida da Tanzânia, Zâmbia, Zimbábwe;
- 0 casos: Benin, Botswana, Burkina Faso, Burundi, Etiópia, Gâmbia, Gana, Guiné-Bissau, Libéria, Mali, Moçambique, Namíbia, Niger, Ruanda, Senegal, Serra Leoa, Swazilândia e Togo. A transmissão nestas zonas parece ter terminado, mas existem ainda algumas áreas onde é complicado

estabelecer este facto com certeza, devido a dificuldades de acesso de atividades de rastreio e diagnóstico.

1.3.1.3 – Epidemiologia

Como já foi referido (ver **1.3.1**), a THA é causada pela infeção com um de dois microorganismos, *T. b. gambiense* ou *T. b. rhodesiense*. A infeção causada por *T. b. gambiense* causa uma doença crónica que afeta as regiões da África Central e Ocidental, e é a forma mais comum da doença, com cerca de 90% de todos os casos (Aksoy 2011). Esta forma da doença é transmitida por glossinas do grupo *Palpalis*, e está associada a zonas na proximidade de rios, lagos e locais de coleta de água perto de aldeias, onde as pessoas entram em contacto com o vetor infetado (Burri & Brun 2009).

A infeção causada por *T. b. rhodesiense* provoca uma doença mais aguda, e afeta sobretudo países da África Oriental e do Sul. Esta forma da doença é transmitida por glossinas do grupo *Morsitans*, com exceção do Uganda, um país onde se assiste a uma sobreposição das duas formas da doença (**Figura 4**).



Figura 4 - Mapa de África, com linha divisória entre os locais de transmissão de *T. b. gambiense* (esquerda da linha) e *T. b. rhodesiense* (direita da linha). O país marcado a cinzento é o Uganda, onde existe sobreposição das duas espécies. Dados: (Brun et al. 2010)

Neste caso, a forma *rhodesiense* da patologia é também transmitida por um vetor do grupo *Palpalis*, a *Glossina fuscipes* spp (Burri & Brun 2009). As glossinas do

grupo *Morsitans* têm preferência por *habitats* do tipo *savannah*, e picam preferencialmente animais peridomésticos e selvagens, apenas picando humanos quando os hospedeiros normais não estão disponíveis. É por este motivo considerada uma zoonose, e está historicamente associada a grupos cuja atividade os colocam em contacto mais frequente com o vetor, como por exemplo caçadores, coletores de lenha e pescadores (Burri & Brun 2009).

1.3.1.4 – Ciclo de transmissão

O ciclo de transmissão completo de *T. b. gambiense/ rhodesiense* tem duas fases: uma passada no vetor, outra passada no hospedeiro humano.

No caso do ciclo no vetor, este assunto já foi abordado anteriormente (ver 1.2.3.2). Contudo, como não se especificou o ciclo de *T. b. gambiense/ rhodesiense*, o mesmo será agora explicado com mais pormenor.

O parasita entra no vetor através do seu aparelho bucal, durante a alimentação por picada do mesmo a um hospedeiro humano (ou reservatório animal) infetado. Apenas os parasitas que se encontrem na forma *short/stumpy* são capazes de continuar o seu desenvolvimento dentro do vetor (Vickerman et al. 1988). Dentro do vetor, os parasitas são levados, juntamente com a refeição sanguínea, até à região do intestino médio. Nesta região as glossinas possuem concentrações elevadas de proteases, pelo que para conseguirem sobreviver os tripanossomas têm que conseguir diferenciar-se em tripomastigotas procíclicos, um evento que ocorre dentro de 24 horas (Sharma et al. 2009). Esta diferenciação permite que os parasitas consigam romper a membrana peritrófica e, a partir do espaço ectoperitrófico, migrar para a cárdia. Aí sofrem uma divisão celular assimétrica, que cria um tripomastigota metacíclico longo e um tripomastigota metacíclico mais curto, que se presume ser a forma que coloniza as glândulas salivares (Roditi & Lehane 2008). O ciclo no vetor termina com a colonização das glândulas salivares e diferenciação em formas metacíclicas infetantes, que depois são passadas ao hospedeiro humano durante a picada. Toda esta fase demora entre 3 a 5 semanas (Brun et al. 2010).

No hospedeiro humano, os parasitas metacíclicos rapidamente se transformam em tripomastigotas sanguíneos (esguios) e dividem-se por fissão binária no espaço

intersticial na zona da lesão da picada. Uma vez na corrente sanguínea, os tripomastigotas vão alterando as características antigénicas da sua parede celular para melhor escaparem ao sistema imune do hospedeiro. Os parasitas, quando está estabelecida a infeção, formam uma população morfológicamente heterogénea, que inclui as formas esguias durante a fase de ascensão da parasitémia, até à forma *short/stumpy* no pico da parasitémia. Nesta última morfologia, os parasitas não proliferam, e estão na fase que lhes permite continuar o seu desenvolvimento no vetor, que, se picar o hospedeiro humano, completa o ciclo de transmissão (Baral 2010).

1.3.1.5 – Sinais e sintomas clínicos

Ambos os tipos de parasita provocam doença no Homem que se pode organizar em duas fases distintas: a fase hemolinfática e a fase meningoencefálica.

Durante a fase hemolinfática, os parasitas multiplicam-se nos tecidos subcutâneos, linfa e sangue. Os principais sintomas durante esta fase são dores de cabeça, febre irregular, mialgias, linfadenopatias (uma das mais comuns é a que leva ao aumento dos nódulos linfáticos cervicais – sinal de Winterbottom), fadiga e mal-estar geral, podendo também ocorrer edemas transitórios (maioritariamente da face), anemia, e disfunções endócrinas (Burri & Brun 2009).

Durante a fase meningoencefálica dá-se a invasão do Sistema Nervoso Central (SNC) por parte dos tripanossomas, e é nesta fase que os sintomas mais característicos da patologia aparecem, como as mudanças de humor, confusão, alterações sensoriais, má coordenação motora e alterações do padrão de sono-vigília (Burri & Brun 2009).

De um modo geral, as principais diferenças entre os dois tipos de doença, Gambiense e Rhodesiense, prendem-se com a duração e a gravidade da infeção. Ambas as formas da doença levam à morte, mas no tipo Gambiense a patologia desenvolve-se de forma crónica, sendo um processo que evolui durante anos. No tipo Rhodesiense, em contrapartida, a patologia é aguda, com uma evolução mais rápida, podendo levar à morte no espaço de alguns meses (Burri & Brun 2009).

1.3.1.6 – Diagnóstico

O diagnóstico da patologia pode ser efetuado no terreno, ou em meio laboratorial.

No caso do diagnóstico no terreno, a principal ferramenta para o diagnóstico da infecção por *T.b. gambiense* é o *Card Agglutination Test for Trypanosomiasis* (CATT), que é um teste de aglutinação para pesquisa de anticorpos específicos no soro, plasma, sangue total ou líquido de pacientes de THA. O reagente é formado por uma solução contendo tripanossomas (variante antigénica LiTat 1.3) liofilizados, corados com Azul de Coomassie, que quando colocado em contacto, num cartão próprio, com sangue do paciente contendo anticorpos específicos, forma aglutinação visível a olho nu (Chappuis et al. 2005). Este teste apresenta uma sensibilidade que varia entre 87% e 98% e uma especificidade reportada de 95% (Chappuis et al. 2005), mas tem as desvantagens de não servir para distinguir doença ativa de cura, uma vez que os anticorpos tendem a manter-se no organismo do indivíduo por períodos prolongados (Ndung'u et al. 2010) e por não existir um formato para deteção de anticorpos anti-*T. b. rhodesiense* (Burri & Brun 2009).

No diagnóstico no terreno podem ainda ser efetuados o exame direto de suco ganglionar, observação de gota espessa, e, no caso de positividade dos restantes testes, uma punção lombar para análise parasitológica, celular e bioquímica do líquido cefalorraquidiano (LCR) (Atouguia 2005). A análise do LCR é importante para o estadiamento da doença, ou seja, se esta se encontra no estadio hemolinfático ou no estadio meningoencefálico. Convencionalmente, este estadiamento é efetuado recorrendo a parâmetros do LCR, nomeadamente a presença de formas do parasita e/ ou uma contagem de leucócitos superior a 5 células/mm³ (Burri & Brun 2009), muito embora estes valores não sejam consensualmente aceites. Métodos que não impliquem a colheita de LCR têm igualmente sido estudados (Hainard et al. 2009).

Quanto ao diagnóstico laboratorial, pode incluir testes de deteção de antígenos (como ELISA – *Enzyme Linked ImmunoSorbent Assay*), de deteção de anticorpos (como testes de aglutinação, hemaglutinação e fixação do complemento), e de deteção de Ácido Desoxirribonucleico (ADN) (Atouguia 2005). Durante os últimos anos têm sido desenvolvidas técnicas que utilizam a *Polimerase Chain Reaction* (Reação de

Polimerase em Cadeia – PCR), para o diagnóstico laboratorial da doença (Njiru et al. 2005; Malele et al. 2003; Picozzi et al. 2008; Cox et al. 2005).

1.3.1.7 – Tratamento

O tratamento é diferente consoante a doença se encontre no estadio hemolinfática ou no estadio meningoencefálico, e consoante se trate da apresentação gambiense ou *rhodesiense* da patologia (Barrett et al. 2007).

Na primeira fase os medicamentos utilizados são a pentamidina, para a forma gambiense, e a suramina para a forma *rhodesiense*.

Na segunda fase os medicamentos utilizados são o melarsoprol e a eflornitina, embora nos últimos anos tenha vindo a ser utilizada uma combinação de eflornitina com nifurtimox (NECT – *Nifurtimox Eflornithine Combination Treatment*), com resultados promissores (Bacchi 2009).

Os medicamentos utilizados para o tratamento da doença no estadio meningoencefálico são muito tóxicos para o organismo, podendo inclusivamente causar a morte, sendo por isso importante o estadiamento correto da patologia.

1.3.2 – Tripanossomose Animal

1.3.2.1 – Descrição geral

A tripanossomose animal é uma designação genérica utilizada para patologias que afetam muitas espécies de animais, e são causadas por espécies diferentes de tripanossomas.

A distribuição destas patologias é semelhante à da THA (ver **1.3.1.3**), mas vai além desta, uma vez que existe transmissão na ausência de *Glossina*, possivelmente por transmissão mecânica através da picada de moscas de outras espécies (Atouguia 1998).

As espécies de tripanossomas transmitidos por *Glossina* que infetam animais domésticos incluem *T. vivax*, *T. congolense*, *T. brucei brucei* e *T. simiae*, bem como os parasitas infetantes para o Homem *T. brucei gambiense* e *T. brucei rhodesiense*.

Os animais em risco incluem gado bovino, cabras, porcos, cavalos, burros e camelos, entre outros (Swallow 1999).

1.3.2.2 – Importância socioeconómica

De acordo com Swallow (1999), a distribuição de *Glossina* spp. e a tripanossomose animal são responsáveis por uma teia de influências, diretas e indiretas, que afetam a agricultura a vários níveis.

Segundo o autor, a tripanossomose animal condiciona diretamente: a escolha do local de pastagens, podendo mesmo levar a migrações de populações para locais em que a doença não está presente; a gestão da pecuária, nomeadamente ao nível da escolha das espécies de animais (se são mais ou menos resistentes à patologia) e ao tamanho das manadas; e a produtividade da actividade pecuária, medida na produção de carne e leite, na eficiência da tração animal e nos gastos com medicamentos. Estes fatores vão depois influenciar indiretamente a produção agrícola (área cultivada, tipos de cultivo, etc.) e o proveito para as populações destes tipos de atividades.

Estimativas foram já efetuadas quanto ao custo da tripanossomose animal, bem como a possíveis ganhos com campanhas bem sucedidas de controlo da doença. Assim, em média no continente africano, os ganhos potenciais em produtividade resultam numa redução de 38% no custo de produção do leite e de 25% do custo por tonelada da produção de carne. Esta mudança produziria ganhos estimados em 702 milhões de dólares americanos/ ano (Kristjanson et al. 1999).

1.4 – República da Guiné-Bissau

1.4.1 – Características gerais

1.4.1.1 - Geografia

A República da Guiné-Bissau (RGB) é um país que se encontra localizado na costa ocidental de África, na parte do continente pertencente ao hemisfério norte. Faz fronteira com a República do Senegal a norte, com a República da Guiné a este e a sul e com o oceano Atlântico a oeste.

Apresenta uma área total de 36,125 Km², sendo 28,120 Km² respeitantes a superfície emersa e 8005 Km² a superfície submersa (Instituto Nacional de Estatística e Censos 2005).

1.4.1.2 – Aspetos sócio-demográficos

O país encontra-se administrativamente organizado em oito regiões e um setor autónomo, a saber as regiões de Bafatá, Biombo, Bolama/ Bijagós, Cacheu, Gabú, Oio, Quinara, Tombali e o setor autónomo de Bissau, a capital.

A projeção para 2010 do número de habitantes total do país era de 1,558,090 pessoas, e a esperança média de vida é de 43,4 anos para homens e 46,2 anos para mulheres (Instituto Nacional de Estatística e Censos 2005).

1.4.2 – Revisão histórica de THA na RGB

1.4.2.1 - Introdução

A primeira descrição de THA na RGB foi efetuada por Aleixo Justiniano Sócrates da Costa, em 1874 (Atouguia 1998). Em 1913, Ayres Kopke foi o primeiro também a fazer referência a moscas do género *Glossina* nesta ex-colónia (Grácio 1999). Numa tentativa de avaliar a situação da patologia, Portugal foi o primeiro país a enviar missões de estudo para as suas colónias (Atouguia 1998). Assim, em 1932, Fontoura de Sequeira chefiou a Missão da Escola de Medicina Tropical à RGB, visitando um total de 67 tabancas, para estudar a prevalência da patologia (Ferreira 1947). Missões haviam

sido já efetuadas em outras colónias portuguesas. O chefe da missão, Aníbal Bettencourt, e seus colaboradores, Ayres Kopke, Gomes de Rezende e Corrêa Mendes visitaram as ilhas de São Tomé e Príncipe e o território de Angola, em 1901 (Atouguia 1998).

Posteriormente, em Maio de 1945, foi criada por Decreto nº 34.611 a Missão de Estudo e Combate da doença do sono na Guiné Portuguesa (Ferreira 1947), estando organizada nas secções de Investigação, de Recenseamento e tratamento de doentes e de Combate às glossinas, tendo esta última sido constituída a 2 de Dezembro de 1949 (Almeida 1950).

Com a independência da colónia, em 1974, foi interrompida a actividade da Missão.

1.4.2.2 – Prevalência patologia

Os primeiros dados do recenseamento de doentes da Missão de Estudo e Combate da doença do sono na Guiné Portuguesa, apresentados em 1946, foram referentes a apenas três ilhas (Bissau, Bolama e Galinhas), escolhidas por serem os centros mais populosos e onde a densidade de população europeia era maior (Ferreira 1947).

Haviam sido até então efetuadas 15,689 observações, sendo que 404 dos indivíduos observados foram diagnosticados como sofrendo de THA. A prevalência, em percentagem, era então de 2,6%. Importa referir que mais de 50% dos doentes apresentava a doença no estadio meningoencefálico (Ferreira 1947).

Três anos mais tarde, em finais de 1949, uma atualização a estes dados informou que a Missão havia observado 229,020 indivíduos, encontrando 3,779 doentes, casos estes dispersos por todo o território da colónia (O Primeiro de Janeiro 1950).

1.4.2.3 – Capturas e grau de infestação de *Glossina*

Num trabalho apresentado na 2ª Reunião Médica da Missão de Estudo e Combate da Doença do Sono, em 1950, Carlos Lehmann de Almeida apresentou os dados obtidos até então nos trabalhos de estudo de *Glossina* efetuados na ex-colónia.

Relativamente às capturas, num total de 44,445 moscas do género *Glossina*, 35,793 eram da espécie *palpalis* (80,5%), 7,301 da espécie *longipalpis* (16,4 %), 1,346 da espécie *morsitans submorsitans* (3%) e 5 da espécie *fusca fusca* (0,01%) (Almeida 1950).

No que toca ao grau de infestação por tripanossomas, num total de 6,509 moscas dissecadas 290 encontravam-se infestadas, o que representa uma percentagem de 4,46%. A maior parte destas (145 – 50%) estava infestada com tripanossomas pertencentes a um grupo que incluía *T. brucei*, *T. gambiense*, e *T. rhodesiense*, que na altura ainda não estavam definidos como sendo subespécies de *T. brucei*. As moscas infestadas com *T. congolense* e *T. vivax* apareciam como as segundas mais frequentes (102 – 35%), seguidas das infestadas por *T. grayi* (9 – 3%). Por último, 34 moscas (12%) encontravam-se infestadas por tripanossomas indeterminados (Almeida 1950).

1.4.3 – Situação atual de THA na RGB

1.4.3.1 - Prevalência patologia

A República da Guiné-Bissau não tem atualmente nenhuma estrutura dedicada à supervisão de casos de THA (Gautret et al. 2009). Por este motivo, muito embora o país se encontre listado como sendo um dos países onde não existe THA, não tendo sido reportados casos no período de 2000 a 2009 (Simarro et al. 2010), seria importante realizar esforços no sentido de clarificar a situação epidemiológica (Simarro et al. 2011).

Um dos países com os quais faz fronteira, a República da Guiné, é dos que apresenta na África Ocidental uma das maiores incidências de casos de THA, com 861 casos no mesmo período de nove anos (Simarro et al. 2010).

1.4.3.2 - Capturas e grau de infestação de *Glossina*

Em 1991, um estudo efetuado na floresta Jopa-Cobiana, no nordeste da RGB, capturou 3.172 glossinas, das quais 96% pertenciam à espécie *G. longipalpis*, 3% a *G. morsitans submorsitans* e 1% a *G. palpalis gambiensis* (Jaenson et al. 1991).

Numa pesquisa efetuada entre 1989 e 1994 foi descrita a presença na RGB das espécies *Glossina longipalpis*, *Glossina morsitans submorsitans* e *Glossina palpalis gambiensis* (Grácio 1999). Este trabalho não apresentava, contudo, o número de moscas capturadas nem a percentagem de cada uma das espécies.

No trabalho mais recente, realizado entre 5 de abril e 19 de maio de 2004, foram capturadas e identificadas 1238 glossinas pertencentes às mesmas espécies identificadas por Grácio, com a seguinte distribuição: 99,11% de *G. palpalis gambiensis*, 0,49% de *G. longipalpis* e 0,40% de *G. morsitans submorsitans* (Badjana 2004).

Em pesquisa bibliográfica não se encontraram artigos recentes com dados sobre o grau de infestação de *Glossina* por tripanossomas, realizados na RGB.

1.4.4 – Tripanossomose animal na RGB

Não se encontraram, em pesquisa bibliográfica, informações recentes referentes à infecção por tripanossomas em animais na RGB.

Foi efetuada por outro autores, contudo, uma revisão histórica a estudos de prevalência de tripanossomose animal, indicando quais os animais afetados e quais os tripanossomas responsáveis pela infecção.

Assim, existem descrições de *T. vivax* em gado bovino, cabras, ovelhas e cavalos, *T. congolense* em gado bovino, cabras, ovelhas, porcos, burros e cavalos e de *T. brucei* em gado bovino, porcos, burros e cavalos. Todas as fontes utilizadas nessa revisão histórica são anteriores a 1949, não havendo por isso informação atualizada em relação a este assunto (Crespo & Rosa 2004).

1.5 – Métodos de Biologia Molecular

1.5.1 – Reação em cadeia da polimerase

1.5.1.1 – Introdução

A reação em cadeia da polimerase, é uma metodologia, desenvolvida por Kari Mullis em 1983, que permite amplificar ADN a partir de um número reduzido de cadeias, formando milhares a milhões de cópias dessas cadeias originais (Bartlett & Stirling 2003).

O método baseia-se na utilização de uma polimerase de ADN, sendo uma das mais comuns a *Thermus aquaticus polymerase* (Taq polimerase), e de sequências iniciadoras (*primers*) específicas (Alberts et al. 2002).

Para uma explicação mais aprofundada da metodologia, qualquer livro dedicado ao estudo de técnicas de biologia molecular será satisfatório.

1.5.1.2 – Estudos relevantes efetuados com recurso ao método

O desenvolvimento de técnicas de deteção de ácidos nucleicos de tripanossomas iniciou-se ainda durante a década de 1980. Inicialmente, foram utilizadas sondas de ADN aplicadas a técnicas de *dot-blot* e hibridização *in situ* (Gibson et al. 1988; Kukla et al. 1987). Contudo, estes métodos foram sendo cada vez menos utilizados, sendo substituídos pelos que utilizam PCR, graças à sua maior sensibilidade (McNamara et al. 1995; Gibson 2002).

A determinação da distribuição e prevalência de tripanossomas patogénicos para animais e humanos é um ponto fulcral em qualquer estratégia de combate às patologias por eles provocadas. Um ponto importante para essa determinação é a identificação correta de infeções em moscas *Glossina* por parte desses tripanossomas, não só ao nível subgenérico como abaixo deste (McNamara et al. 1995). Historicamente, esta pesquisa tem sido efetuada com recurso a técnicas de disseção de moscas e pesquisa microscópica de tripanossomas nos diversos órgãos (Lloyd & Johnson 1924). Contudo, este método é impreciso, uma vez que não consegue distinguir entre tripanossomas que apresentem o mesmo tipo de desenvolvimento na *Glossina*, estando também dificultada

a identificação de infecções imaturas e infecções mistas (Adams et al. 2008). Nesse sentido, têm sido desenvolvidos ao longo dos anos *primers* específicos para diversas espécies de tripanossoma.

Em 1989 foram desenvolvidos *primers* para a detecção de ADN de *T. brucei sensu lato* e de *T. congolense sensu lato*, com base em sequências repetitivas de ADN no genoma de ambos os parasitas (Moser et al. 1989). A utilização de sequências repetitivas permite um aumento da sensibilidade do método, por oposição àqueles que utilizem genes com representação única no genoma, pelo simples facto de um único parasita apresentar diversas cópias do gene alvo. Com o decorrer dos anos, foram sendo desenvolvidos *primers* para as mais diversas espécies de tripanossomas: *Trypanosoma congolense (Riverine/Forest)* (Masiga et al. 1992), *T. congolense (Kilifi)* (Masiga et al. 1992), *T. congolense (Savannah)* (Masiga et al. 1992), *Trypanosoma vivax* (Masake et al. 1997; Masake et al. 1994), *Trypanosoma simiae* (Masiga et al. 1992), *Trypanosoma evansi* (Artama et al. 1992) e *T. congolense (Kenya Coast)* (Masiga et al. 1992).

Esta situação levantava dois problemas: por um lado, não existiam ainda *primers* que permitissem distinguir a um nível subespecífico parasitas claramente delimitados em termos de características de infetividade e transmissão, como as subespécies de *T. brucei* (Gibson 2002); por outro, para se conseguir identificar corretamente uma espécie de tripanossoma seria necessário efetuar até oito reações de PCR por amostra, o que aumentaria os custos e dificultaria na sua utilidade como técnica em estudos epidemiológicos de grande escala (Cox et al. 2005). O primeiro destes problemas foi abordado e culminou com o desenvolvimento de *primers* específicos para *T. b. rhodesiense*, que amplificam o gene de resistência ao soro humano (*Serum Resistance Antigen – SRA*), apenas existente nesta subespécie (De Greef et al. 1992), e de *primers* específicos para *T. b. gambiense*, que amplificam uma glicoproteína específica da membrana celular (*T. b. gambiense-specific glycoprotein – TgsGP*) deste parasita (Radwanska et al. 2002). O segundo foi abordado com a tentativa de desenvolvimento de *primers* que amplificassem regiões do genoma dos diferentes parasitas, cujo produto permitisse diferenciar entre as várias espécies. Um dos conjuntos de *primers* mais utilizados, dentro dos que utilizam este tipo de abordagem, são os que amplificam a região do genoma onde se encontram os espaçadores internos transcritos (*internal*

transcribed spacers 1 – ITS1), entre os genes que codificam para o ARN ribossomal (Figura 5).

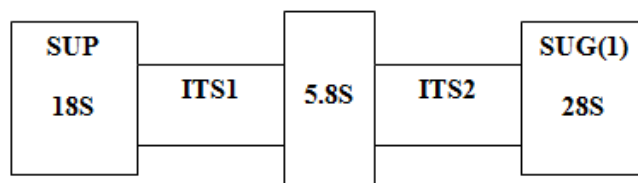


Figura 5 - Representação esquemática de parte do gene que codifica para o ARN ribossomal de *Trypanosoma* spp. Legenda: SUP – Subunidade pequena; SUG – Subunidade grande; ITS – *Internal Transcribed Spacer*.

Estes espaçadores têm a característica de variarem em número de pares de bases entre diferentes espécies e até subespécies de *Trypanosoma* (Njiru et al. 2005), permitindo distingui-las numa única reação, com um par de *primers*. Este local foi escolhido por apresentar um elevado número de cópias no genoma dos parasitas (entre 100 e 200), e por estar flanqueado por regiões do genoma muito conservadas (Adams et al. 2008). Num trabalho onde se determinou a sensibilidade destes *primers* para diferentes espécies de tripanossoma, chegou-se à conclusão que esta era igual (10 µg) para *T. (Duttonella) vivax*, *T. (Nannomonas) congolense* e *T. (Trypanozoon) brucei* (Njiru et al., 2005).

Estes *primers* não permitem, contudo, distinguir entre as subespécies de *T. brucei* (Cox et al. 2005). No presente estudo, para se conseguir efetuar esta distinção, foram utilizados os *primers* Tb177, que amplificam a mesma região repetitiva do ADN dos parasitas que os desenvolvidos por Moser (Moser et al. 1989; Becker et al. 2004), e os *primers* TgsGP (Radwanska et al. 2002).

Apesar do seu valor enquanto método para diagnóstico e estudos epidemiológicos, o PCR não é uma técnica quantitativa, o que seria de grande utilidade em trabalhos que requeiram a determinação da quantidade de parasitas em determinada amostra biológica, como por exemplo estudos de avaliação da eficácia de protocolos terapêuticos (Rolão 2004).

1.5.2 – PCR em tempo real

1.5.2.1 – Introdução

Possibly the greatest revolution in amplification technology since the advent of PCR has been the development of systems that monitor amplification in real-time.

(Monis et al. 2005)

Os métodos moleculares baseados em PCR convencional apresentam várias limitações, que dificultam a sua utilização como métodos quantitativos, como a análise de produtos de amplificação apenas no final da reação, quando esta já se encontra numa fase de saturação, na qual há uma menor formação de novas cadeias de ADN e acumulação de fatores de inibição (Bell & Ranford-Cartwright 2002). Assim, a partir de determinado ciclo, a formação de novas cadeias já não decorre a um ritmo exponencial, e algumas reações irão gerar mais produto que outras, por fatores que não dependem da quantidade inicial de amostra. Com a habilidade de medir a quantidade de produtos de ADN à medida que estes se vão acumulando, é possível medi-los quando a reação se encontra na fase exponencial, e apenas durante esta fase se consegue extrapolar a quantidade inicial de amostra (Ginzinger 2002).

Os métodos de PCR em tempo real utilizam compostos fluorescentes para monitorizar em tempo real a reação de amplificação. Estes compostos podem ser divididos em dois grupos: os que utilizam corantes intercalantes de ADN em cadeia dupla, e os que usam sondas de ADN em cadeia simples, de diversos tipos. Neste trabalho vão ser realizadas reações de PCR em tempo real que utilizam um corante intercalante (*SYBR® Green I*), e reações que utilizam uma sonda de hidrólise (*Taqman®*), pelo que apenas se vai explicar estas duas variantes da metodologia. Para informações mais detalhadas sobre as restantes metodologias de deteção aconselha-se a leitura do artigo de revisão de Mackay (Mackay 2004).

O sistema de deteção com *SYBR® Green I* baseia-se no facto de este ser um composto que só emite fluorescência quando se encontra ligado a ADN em cadeia dupla

(desde que excitado por uma fonte de luz incidente). Assim, ao longo da reação de PCR, à medida que vão sendo formadas novas cadeias de ADN, maior vai sendo o sinal de fluorescência emitida pelo composto e consequentemente medida pelo equipamento (**Figura 6**).

Este sistema de detecção é o menos dispendioso, mas os ensaios que o utilizam têm que ser exaustivamente otimizados para evitar que se formem dímeros de *primers*, uma vez que existe a possibilidade de o corante se intercalar nestes produtos inespecíficos (Ginzinger 2002).

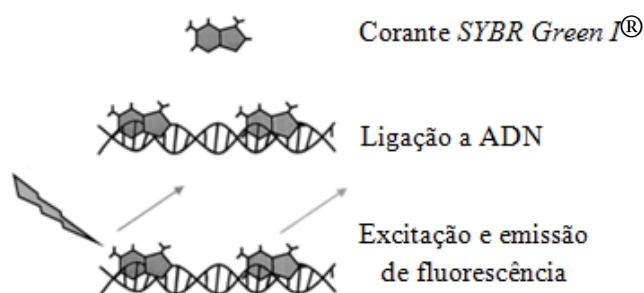


Figura 6 - Modo de atuação do corante SYBR® Green I (Adaptado de (Ginzinger 2002))

Apesar disto, este sistema permite a visualização de curvas de dissociação, o que possibilita a detecção de produtos de amplificação inespecíficos, uma vez que cada produto formado na reação possui uma temperatura de dissociação específica, dependente da quantidade de guaninas (G) e citosinas (C) que tem na sua sequência (Rolão 2004). Esta característica permite assim diferenciar diferentes produtos de amplificação consoante a temperatura a que as cadeias desses produtos se dissociam, inibindo assim a libertação de fluorescência por parte do corante SYBR® Green I.

O sistema de detecção com sondas Taqman® tira proveito da atividade da 5' exonuclease da ADN polimerase, que vai hidrolisar a sonda quando esta se encontra ligada ao produto amplificado (Bell & Ranford-Cartwright 2002), originando deste modo a emissão de fluorescência (**Figura 7**, na página seguinte).

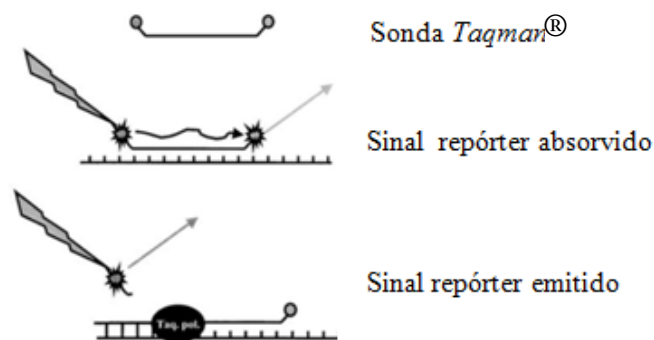


Figura 7 - Modo de atuação da sonda de hibridação Taqman® (Adaptado de (Ginzinger 2002))

Neste método, uma sonda de hibridação de ADN é marcada nas suas extremidades com dois fluoróforos, um emissor ou repórter na extremidade 5' (normalmente FAM; 6- carboxi-fluoresceína), e um recetor da energia libertada pelo repórter na extremidade 3' (normalmente TAMRA; 6-carboxi-tetrametil-rodamina). Quando a sonda sofre a ação da 5' exonuclease, o fluoróforo repórter vai dissociar-se da mesma, afastando-se do raio de ação do fluoróforo recetor. Assim, a fluorescência libertada pelos fluoróforos em solução é indicativa da quantidade de cadeias de ADN que se formaram durante a fase de extensão da reação de PCR (Mackay 2004), sendo o resultado expresso em número de ciclos decorridos. Assim, o número fracionário do ciclo a partir do qual a fluorescência atinge um determinado valor pré-definido (usualmente 10 a 20 desvios-padrão do sinal de fluorescência de base, ou seja, obtido durante os primeiros ciclos de PCR), denominado *cycle threshold* (Ct), é preditivo, com relação inversa, do número de moléculas de ADN presentes no início da reação (Bell & Ranford-Cartwright 2002).

Para se conseguir determinar o número de moléculas de ADN presentes na amostra inicial uma das metodologias, e a que é utilizada neste trabalho, é a criação de uma curva de calibração, em que se preparam soluções com diferentes concentrações conhecidas de um controlo positivo, numa gama de valores com várias ordens de magnitude (normalmente 6 ou 7), associando assim determinado valor de fluorescência a determinada concentração esperada de produto amplificado. Os valores obtidos através da curva de calibração servem depois também para calcular a eficiência da reação (Pfaffl 2004), através da equação apresentada na página seguinte (**Equação 1**).

$$E(\%) = (10^{(-1/\text{declive})} - 1) \times 100$$

Equação 1 - Fórmula para calcular a eficiência da reação de PCR em tempo real, utilizando uma curva de calibração. Legenda: E - eficiência

1.5.2.2 – Estudos relevantes efetuados com recurso ao método

Estudos utilizando esta metodologia foram já realizados para parasitas de outros géneros, como *Toxoplasma gondii* (Lin et al. 2000), *Borrelia burgdorferi* (Piesman & Schneider 2001), *Plasmodium falciparum*, *P. vivax* e *P. ovale* (Perandin et al. 2004) e *Leishmania infantum* (Rolão et al. 2004).

Em relação a estudos utilizando PCR em tempo real para tripanossomas, apenas se encontrou em pesquisa bibliográfica um estudo em que se efetua deteção de *T. brucei sensu lato* em amostras de sangue humano (Becker et al. 2004). Os autores recorrem à metodologia que utiliza o corante intercalante de ADN em dupla cadeia SYBR® Green I, e conseguiram identificar e quantificar *T. brucei gambiense* no sangue de pacientes que haviam sido já diagnosticados. Os *primers* utilizados pelos autores (Tb177) não permitem distinguir entre as subespécies de *T. brucei*, pelo que a identificação do parasita foi feita presuntivamente pelo histórico dos pacientes (nomeadamente zona geográfica onde haviam sido infetados).

A comprovar isto mesmo, e a demonstrar a utilidade deste tipo de metodologia, está a apresentação de um caso clínico de um paciente infetado com *T. brucei rhodesiense* na Tanzânia, em que os autores efetuam PCR em tempo real, utilizando os *primers* Tb177 desenvolvidos por Becker et al. A quantificação dos parasitas permitiu uma avaliação da progressão da infeção a partir da administração terapêutica, bem como uma comparação com os valores da temperatura corporal do paciente (Vingerhoets et al. 2011). A utilização dos *primers* Tb177 para *T. b. rhodesiense* demonstra a inespecificidade dos mesmos a um nível subespecífico.

1.5.3 – Enzimas de restrição

1.5.3.1 – Introdução

Uma enzima de restrição, ou endonuclease de restrição, é uma enzima que corta ADN em cadeia dupla em sequências específicas de nucleótidos, conhecidos como locais de restrição. Estas enzimas são naturalmente formadas por bactérias, e pensa-se que terão evoluído como mecanismos de defesa das bactérias contra vírus invasores. As bactérias protegem o próprio ADN da atividade das enzimas recorrendo à metilação das bases de guanina e adenina, ao mesmo tempo que destroem o ADN invasor, não metilado (Alberts et al. 2002).

A associação de PCR a enzimas de restrição resulta numa técnica denominada *PCR Restriction Fragment Length Polymorphism* (PCR-RFLP), na qual as amostras em estudo são primeiro sujeitas a uma reação de PCR, para amplificação do ADN alvo, e posteriormente o produto amplificado é digerido pelas endonucleases, e submetido a eletroforese em gel de agarose ou poliacrilamida (*Polyacrylamide Gel Electrophoresis* – PAGE). Para um mesmo gene, partilhado por organismos de várias espécies, por exemplo, diferenças na sequência de ADN amplificado vão originar locais de restrição diferentes, e consequentemente tamanhos diferentes de bandas na eletroforese, formando variados padrões de restrição que permitem distinguir entre as várias espécies (Voet & Voet 2004).

1.5.3.2 – Estudos relevantes efetuados com recurso ao método

Em pesquisa bibliográfica apenas foi possível identificar um artigo dedicado a tripanossomose animal em que se recorreu a esta técnica.

Os autores utilizam o gene que codifica para a região da subunidade pequena (18S) do ribossoma (ver **Figura 5**), por este ser um gene com regiões altamente conservadas (importante para a ligação dos *primers*), mas ao mesmo tempo com variações na cadeia de nucleótidos que são específicas para diferentes espécies de *Trypanosoma*, e presente num *locus* multi-cópia (aumentando a sensibilidade). Utilizaram diferentes enzimas de restrição, como *Msp1*, *Eco571* e *MboII*, conseguindo identificar *T. congolense*, *T. vivax*, *T. brucei brucei*, *T. theileri* e *T. simiae*, reportando

uma sensibilidade equivalente a um genoma de tripanossoma por 40 µL de sangue (Geysen et al. 2003).

1.5.4 - Sequenciação

A sequenciação é uma técnica que permite, como o nome indica, determinar a sequência de nucleótidos de uma cadeia de ADN. Um dos métodos mais comuns para sequenciação é denominado dideoxi, que utiliza a enzima proveniente de *Escherichia coli* ADN polimerase I (Voet & Voet 2004).

Segundo o método automatizado, a cadeia de ADN a sequenciar, presente em cadeia dupla, é inicialmente desnaturada de modo a formar duas cadeias simples. Em solução, para além de estarem presentes os quatro deoxinucleósidos trifosfatados dATP, dCTP, dTTP e dGTP, estão também presentes os mesmos quatro tipos de dideoxinucleósidos trifosfatados, marcados com sondas fluorescentes, que emitem luz a diferentes comprimentos de onda. Estes têm a particularidade de impossibilitar a ligação de novos nucleósidos durante a fase de extensão, por não possuírem o grupo 3'-OH. Assim, na reação são formadas diversas cadeias, com diferentes tamanhos (com um nucleótido de diferença), cada uma marcada com uma sonda fluorescente indicadora do tipo de nucleótido a que estão associados, permitindo assim determinar a sequência do ADN alvo (Voet & Voet 2004).

1.6 – Objetivos

O presente trabalho tem os seguintes objetivos gerais:

- Desenvolvimento e avaliação de metodologias de biologia molecular para quantificação e identificação de parasitas *Trypanosoma* spp. em vetores *Glossina* spp.;
- Determinação das populações de *Trypanosoma* spp. em circulação nos vetores, no território da República da Guiné-Bissau.

Os objetivos específicos são:

- Desenvolvimento de *primers* genéricos que permitam a discriminação, numa mesma reação, de diversas espécies de tripanossoma;
- Desenvolvimento de metodologias de PCR em tempo real com sistemas *SYBR® Green I* e *Taqman®* para identificação e quantificação de tripanossomas em moscas *Glossina* spp.;
- Avaliar quanto à presença na amostra em estudo de parasitas responsáveis pela Tripanossomose Humana Africana;
- Interpretar os resultados obtidos comparando-os com os existentes na literatura para este território.

2 – Materiais e Métodos

2.1 – Caracterização da amostra

2.1.1 – Obtenção das glossinas

Todas as glossinas utilizadas neste trabalho foram disponibilizadas pelo Departamento de Entomologia Médica do Instituto de Higiene e Medicina Tropical (IHMT), tendo sido capturadas e identificadas no âmbito de uma tese de Mestrado em Parasitologia Médica (Badjana 2004).

No final do seu trabalho, Badjana (2004) capturou e identificou 1238 glossinas, de ambos os sexos, nas 8 regiões da RGB (num total de 91 localidades), durante a estação seca.

Depois de mortas, e devidamente caracterizadas quanto ao sexo e espécie, foram separadas e colocadas em tubos plásticos (6 cm de comprimento incluindo a tampa, e 2 cm de diâmetro) com etanol 80% vol, e armazenadas à temperatura ambiente.

Para mais pormenores relativos à captura, aos locais prospetados e à chave de identificação das espécies e subespécies glossínicas utilizada, deve consultar-se a tese supra-referida.

2.1.2 – Seleção das glossinas

Para o presente trabalho, não se utilizaram, por motivos essencialmente logísticos e de gestão de recursos, todas as glossinas capturadas no âmbito do trabalho referido no ponto anterior. Ao invés disso, procurou-se incluir amostras que fossem o mais representativas possível das regiões prospetadas. Para tal procuraram-se as regiões nas quais Badjana (2004) tivesse visitado um maior número de localidades, tendo em consideração a área da região em causa. De acordo com este critério, foram selecionadas amostras das regiões de Biombo, Bolama/ Bijagós e Tombali. A região de Gabú foi também incluída para serem tratadas amostras provenientes do Norte do país.

As tabelas seguintes (**Tabela 5**, **Tabela 6**, **Tabela 7** e **Tabela 8**) contêm os dados de todas as moscas que foram selecionadas e utilizadas neste estudo, por região. Todas as moscas mantêm a identificação que lhes havia sido dada no contexto do trabalho de investigação em que foram capturadas (Badjana 2004), isto é, foi atribuído

um número de ordem a cada uma das localidades visitadas, e um número a cada uma das moscas que fosse capturada, bem como o seu género, após devida discriminação. Assim, por exemplo, a identificação 16.1F indica que a mosca foi capturada na localidade com o número de ordem 16 (no caso, Blim), foi a primeira mosca à qual foi dada identificação dentro desse grupo, e é do sexo feminino.

Tabela 5 - Glossinas da Região de Biombo

Localidade	Nº de ordem	Nº de glossinas		
		♀	♂	Sub-total
Blim	16	4	5	9
Reno	17	0	10	10
Pusto	18	3	6	9
Klelé	21	4	6	10
Safim	22	3	5	8
Quinhamel	23	16	21	37
Biombo	24	5	13	18
Piquil	25	3	9	12
Blom	26	2	6	8
Bijimita	27	13	19	32
Surú	28	20	21	41
Ilondé	29	6	21	27
Cumura de Padre	30	9	0	9
Tôr Pepel	31	7	0	7
Bôr	32	0	9	9
Total		95	151	246

Na região de Biombo foram então seleccionadas 246 glossinas (95 fêmeas e 151 machos), capturadas em 15 localidades, das 17 visitadas por Badjana (2004).

Importa referir que nas últimas três localidades (Cumura de Padre, Tôr Pepel e Bôr), não foram utilizadas nesta tese todas as moscas que haviam sido capturadas.

Tabela 6 - Glossinas da Região de Tombali

Localidade	Nº de ordem	Nº de glossinas		
		♀	♂	Sub-total
Catio Vila	42	6	8	14
Gâ-Palmeira	43	6	11	17
Catio Balanta	44	4	9	13
Cumebú	45	4	8	12
Timbo	46	5	8	13
Bedanda	47	5	6	11
Cubumba	48	2	6	8
Gandua	49	2	7	9
Kom	50	3	7	10
Quebo	51	6	6	12
Camconi	52	6	12	18
Balana	53	3	9	12
Camsorã	54	6	5	11
Porto de N'Puugda	55	2	5	7
Cadique	56	6	11	17
Quilidje	57	6	9	15
Kufar	58	1	15	16
Quilafine	60	0	7	7
Cacine	61	8	19	27
Total		81	168	249

Na região de Tombali foram selecionadas 249 glossinas (81 fêmeas e 168 machos), capturadas em 19 localidades, das 20 visitadas por Badjana (2004).

Tabela 7 (continua na página seguinte) - Glossinas da Região de Bolama-Bijagós

Localidade	Nº de ordem	Nº de glossinas		
		♀	♂	Sub-total
Bubaque	62	6	19	25
Bijante	63	2	8	10
Ancadone	64	1	9	10
Bruce	65	2	10	12
Rubane	66	2	4	6
Uno	67	6	6	12

Localidade	Nº de ordem	Nº de glossinas		
		♀	♂	Sub-total
Giu de Cobra	68	17	22	39
Ponta de Apili	69	0	14	14
Canena	70	6	8	14
Catim	71	1	5	6
Cabopa Cabral	72	0	10	10
Wato	73	2	0	2
São João	74	7	7	14
Total		52	122	174

Na região de Bolama-Bijagós foram utilizadas 174 glossinas (52 fêmeas e 122 machos), sendo que nesta região foram utilizadas moscas de todas as 13 localidades visitadas por Badjana (2004).

Tabela 8 - Glossinas da Região de Gabú

Localidade	Nº de ordem	Nº de glossinas		
		♀	♂	Sub-total
Gabú	83	6	11	17
Candjadu	84	4	8	12
Cabuca	85	5	6	11
Cuntima	86	4	7	11
Buruntuma	87	2	6	8
Chê-chê	88	3	8	11
Pitche	90	7	9	16
Sonaco	91	0	7	7
Total		31	62	93

Na região de Gabú foram selecionadas 93 glossinas (31 fêmeas e 62 machos), provenientes de 8 localidades, das 9 visitadas por Badjana (2004). É de referir também que na localidade de Sonaco (nº de ordem 91) não foram utilizadas nesta tese todas as moscas que haviam sido capturadas.

No total, foram utilizadas 762 glossinas (259 fêmeas e 503 machos), provenientes de 45 localidades.

Todas as glossinas utilizadas neste estudo eram da espécie *Glossina palpalis*, subespécie *gambiensis*, representando esta subespécie 99,11% da amostra estudada por Badjana (2004).

A figura seguinte (**Figura 8**) representa um mapa da República da Guiné-Bissau, com indicação de todas as localidades (segundo o número de ordem atribuído) onde foram capturadas as glossinas utilizadas neste estudo. Apenas as regiões correspondentes se encontram coloridas e identificadas na legenda.

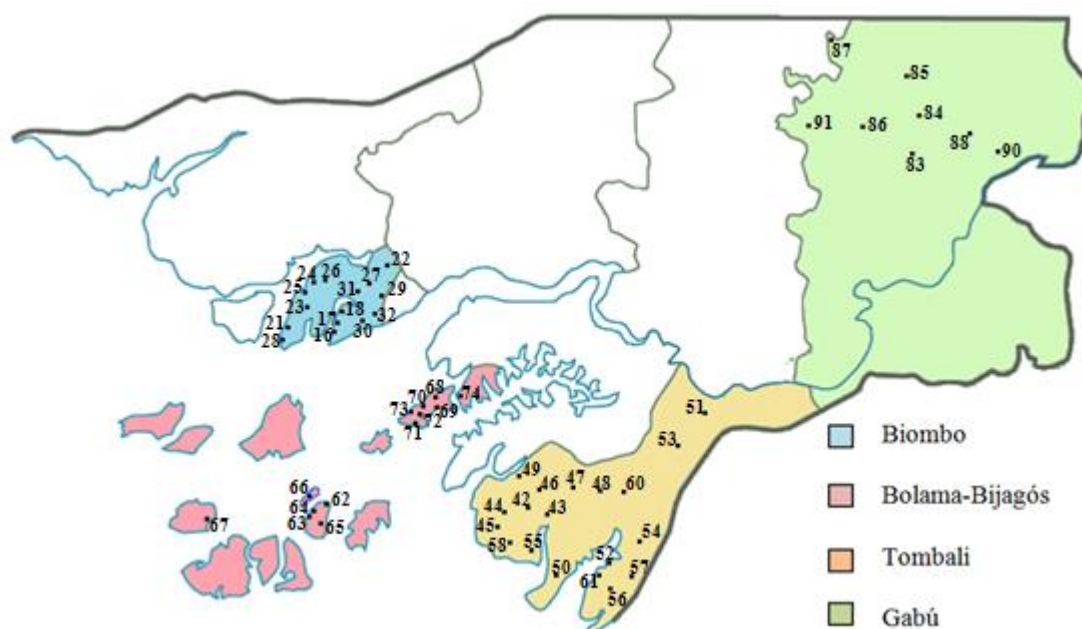


Figura 8 - Mapa da R.G.B., evidenciando as zonas de captura das glossinas utilizadas.

2.2 – Corte das glossinas

Depois de devidamente selecionadas as glossinas a incluir no estudo, procedeu-se então à sua preparação para a posterior extração de ADN. O objectivo foi o de obter, após a disseção, uma parte da mosca para ser utilizada no estudo, e uma outra parte da mosca para ser armazenada, e utilizada apenas para eventual necessidade de repetição do processo de extração de ADN. Utilizou-se então o seguinte procedimento:

1. De cada um dos tubos descritos anteriormente onde as glossinas se encontravam armazenadas, foram transferidas todas para um cadinho com etanol a 90% vol;
2. Cada glossina foi transferida, uma a uma, para uma lâmina de vidro colocada sobre a platina do estereomicroscópio (Zeiss Stemi 2000, ampliação 8x);
3. Com material de corte (bisturi) e pinça entomológica devidamente esterilizados à chama de lamparina, efectuaram-se três cortes (**Figura 9**):
 - a. Um corte transversal entre a cabeça e o tórax da glossina, de modo a separar a cabeça;
 - b. Um corte transversal ao nível dos últimos segmentos abdominais, de modo a separar a genitália;
 - c. Um corte longitudinal, de modo a dividir o tórax e o abdómen em dois.



Figura 9 – Dissecção de *Glossina palpalis gambiensis* como preparação para posterior extração de ADN

À direita, encontra-se a cabeça da glossina após o corte transversal. À esquerda, a secção dos últimos segmentos abdominais. Ao centro, encontram-se as duas metades da glossina (tórax e abdómen) após a secção longitudinal (fotografia tirada ao estereomicroscópio Wild Heerbrugg – Highlight 2100, ampliação 90x, com máquina fotográfica digital Canon Digital IXUSi zoom)

4. Para cada uma das glossinas, a genitália e metade do tórax e abdómen foram colocados num tubo estéril de 1,5 mL de capacidade, com tampa, contendo

álcool etílico a 90% vol., devidamente identificados, e armazenados à temperatura ambiente. Estes tubos apenas seriam utilizados para a eventual repetição do processo de extração do ADN;

5. A cabeça e a outra metade do tórax e abdómen de cada uma das moscas foram também armazenados segundo o mesmo procedimento, mas foram utilizados preferencialmente para o passo subsequente de extração do ADN.

2.3 – Extração de ADN

Para a extração de ADN das glossinas foi utilizado o protocolo para purificação de ADN total a partir de tecidos animais (*“Spin-Column Protocol”*), do *kit* comercial *Dneasy® Blood & Tissue*, da QIAGEN.

A extração foi efetuada de acordo com as indicações do fabricante, com exceção da existência de um passo adicional de maceração da amostra, para promover a ruptura e consequente libertação do conteúdo celular e para facilitar a atividade da enzima proteolítica. Em todas as amostras foi escolhido utilizar para volume de eluição final 100 µL de solução tampão de eluição, de forma a obter amostras com maior concentração de ADN do que se se utilizassem 200 µL, como indicado no *kit*.

Importa referir que este procedimento foi efetuado para 20 amostras de cada vez, juntamente com um branco de extração. Assim, se houvesse contaminação do branco de extração, o que poderia ser indicativo de contaminação entre as amostras, apenas teriam que ser repetidas essas 20 extrações.

Depois das extrações, as soluções contendo ADN foram conservadas num congelador a -20 °C, para posterior utilização.

2.4 – Determinação da concentração de ADN extraído

Para a determinação da concentração e pureza do ADN obtido no passo anterior, para todas as amostras e brancos de extração, foi utilizado o equipamento *NanoDrop™ 1000 Spectrophotometer*. Este equipamento utiliza um sistema de retenção de amostra no qual a mesma é colocada num suporte entre dois feixes de fibra óptica, e mantida em posição pela própria tensão de superfície. Um feixe de luz passa então através da

amostra, e a diferença entre a intensidade da luz incidente e a intensidade da luz transmitida é utilizada para o cálculo da concentração da amostra, com recurso à Lei de Lambert-Beer.

A concentração das amostras era então calculada pelo *software* do equipamento a partir dos valores de absorbância medidos a um comprimento de onda (λ) de 260 nm. A concentração das amostras é apresentada, por defeito, em ng/ μ L.

A pureza da amostra foi determinada através do rácio entre as absorbâncias medidas a $\lambda = 260$ nm e $\lambda = 280$ nm. Um rácio entre 1.8 e 2.0 é normalmente aceitável como indicativo de ADN “puro”. A obtenção de um rácio inferior a 1.8 pode ser uma indicação da presença de proteínas ou outros contaminantes que absorvam luz a $\lambda = 280$ nm.

Para informações mais pormenorizadas sobre este equipamento devem ser consultadas as informações do fabricante.

Todos os dados obtidos com o *software* do equipamento foram exportados para o programa *Microsoft® Office Excel 2007* e para a análise estatística foi utilizado o programa *IBM® SPSS® Statistics* (v. 19; SPSS Inc, Chicago, IL).

2.5 – Primers utilizados e condições de PCR

2.5.1 – PCR convencional

2.5.1.1 – Pontos comuns a todas as reações de PCR convencional

Todas as misturas para as reações de PCR convencional foram preparadas utilizando o *kit illustra™ puReTaq Ready-To-Go PCR Beads*, da *GE Healthcare™*, constituído por pequenas “contas” liofilizadas com todos os reagentes necessários à reação de PCR (com exceção, obviamente, dos *primers* e da amostra), no caso deste trabalho em tubos de 0,2 mL de capacidade. Assim, quando hidratados para 25 μ L (volume final de todas as reações de PCR efetuadas: 23 μ L mistura e 2 μ L de *primers*), obtêm-se as seguintes concentrações de reagentes: 50 mM KCl; 10 mM Tris-HCl; 1,5 mM MgCl₂; 200 μ M dNTPs; 2,5 Unidades Internacionais de *Taq Polimerase*. O pH da

solução é de 9, à temperatura ambiente. As reacções de PCR propriamente ditas foram efetuadas no termociclador *Gene Pro*, da *Hangzhou Bioer Technology Co., Ltd.*

A presença de produto amplificado foi detetada por eletroforese em gel de agarose a 2% (m/m), corado com brometo de etídio (com a concentração de 10mg/mL) e observado com luz ultravioleta. Diferentes *ladders* de ADN de 10, 20 e 100 pares de bases foram utilizadas (O'RangeRuler™ e MassRuler™, da Fermentas), consoante os casos.

2.5.1.2 – Primers GmTub

Para confirmar que a extração de ADN das glossinas foi bem sucedida, e para assegurar a ausência de contaminação cruzada nas extrações, foram utilizados os *primers* GmTubF (5'-ACG TAT TCA TTT CCC TTT GG-3') e GmTubR (5'-AAT GGC TGT GGT GTT GGA CAA C-3'), que amplificam uma porção do gene da tubulina de *Glossina*, um gene constitutivo (Hao et al. 2003). As condições de PCR foram as descritas no artigo original, exceto nos seguintes pontos: a temperatura de hibridização utilizada foi de 50°C, foram efetuados 40 ciclos de amplificação e a quantidade de *primers* utilizados foi de 10 pmol/reacção.

2.5.1.3 – Primers Tb177

A presença de *Trypanosoma brucei s.l.* foi aferida pela utilização dos *primers* Tb177F (5' – AAC AAT GCG CAG TTA ACG CTA T – 3') e Tb177R (5' – ACA TTA AAC ACT AAA GAA CAG CGT TG – 3') que estão direccionados para amplificar a sequência repetitiva de 177 pares de bases de ADN de *T. brucei* (Becker et al. 2004). As condições de PCR estão descritas na tabela apresentada na página seguinte (**Tabela 9**). A quantidade de *primers* utilizados foi de 10 pmol/reacção.

Tabela 9 - Condições de PCR utilizando os *primers* Tb177

Fase	<i>Pré-desnaturação</i>	<i>Desnaturação</i>	<i>Hibridização</i>	<i>Extensão</i>	<i>Extensão final</i>
Temperatura	95°C	95°C	50°C	72°C	72°C
Tempo (mm:ss)	00:60	00:60	00:60	00:60	10:00
Nº ciclos	1	40			1

2.5.1.4 – *Primers* TgsGP (PCR nested)

As amostras que fossem positivas com os *primers* indicados anteriormente, ou seja, indicativos de infecção por *T. brucei s.l.*, foram sujeitas a uma outra reação de PCR, específica para *T. brucei gambiense*. Para tal foi utilizada uma metodologia de PCR *nested* já descrita na literatura (Morrison et al. 2008). De acordo com os autores, é primeiro efetuado um PCR com os *primers* desenvolvidos num outro trabalho (Radwanska et al. 2002), nomeadamente TgsGPF (5' – GCT GCT GTG TTC GGA GAG C – 3') e TgsGPR (5' – GCC ATC GTG CTT GCC GCT C – 3'). Para aumentar a sensibilidade, os produtos de PCR resultantes da primeira ronda são depois sujeitos a uma nova reação de PCR, desta vez com os *primers* TgsGPsense2 (5' – TCA GAC AGG GCT GTA ATA GCA AGC – 3') e TgsGPantisense2 (5' – GGG CTC CTG CCT CAA TTG CTG CA – 3'). As condições de PCR são as originalmente descritas nos respectivos artigos.

2.5.1.5 – *Primers* MC

Em determinada fase do trabalho tornou-se necessário avaliar quanto à possibilidade de contaminação cruzada de algumas amostras com *Leishmania* spp. Para tal utilizaram-se os *primers* MC1 (5' – GTT AGC CGA TGG TGG TCT TG – 3') e MC2 (5' – CAC CCA TTT TTC CGA TTT TG – 3'), que amplificam uma porção dos minicírculos de ADN cinetoplastideal (Cortes et al. 2004). As condições da reação de PCR são as descritas originalmente no artigo citado.

2.5.2 – PCR em tempo real

2.5.2.1 – Pontos comuns a todas as reações de PCR em tempo real

Todas as reações de PCR em tempo real foram efetuadas com recurso ao equipamento *7500 Fast Real Time PCR System*, da *Applied Biosystems™*. O restante material necessário para o PCR em tempo real, nomeadamente a placa com 96 poços (*MicroAmp® Fast Optical 96-Well Reaction Plate with Barcode (0,1 mL)*) e as tampas para tapar os poços durante a reação, evitando evaporação e permitindo a passagem da luz para leitura da fluorescência (*MicroAmp® Optical 8-Cap Strip*) eram da mesma casa comercial. Todas as amostras foram testadas em duplicado.

2.5.2.2 – Primers Tryp18S

No PCR em tempo real realizado com corante não-específico intercalante de ADN em cadeia dupla (*SYBR® Green I*) foram utilizados *primers* desenvolvidos no contexto deste trabalho, nomeadamente Tryp18SF (5' – GAG ATC CAA GCT GCC CAG TA – 3') e Tryp18SR (5' – AGG AGC ATC ACA GAC CTG CT – 3'). Para a mistura de reação foi utilizado um reagente comercial, o *Fast SYBR® Green Master Mix*, da *Applied Biosystems™*, concentrado duas vezes, não especificando, contudo, a concentração dos reagentes, indicando apenas que estão em quantidades ideais para a prática de reações de PCR em tempo real. Cada reação continha 2 µL de H₂O de ultra-pura, autoclavada, 5 µL de *Fast SYBR® Green Master Mix*, 0,5 µL de cada um dos *primers* Tryp18SF e Tryp18SR (5 pmol), à qual eram adicionados 2 µL de amostra, perfazendo um total de 10 µL por reação. As condições de PCR em tempo real para esta experiência estão descritas na tabela seguinte (**Tabela 10**).

Tabela 10 - Condições de PCR em tempo real com SYBR® Green I

Fase	Pré-desnaturação	Desnaturação	Hibridização/Extensão
Temperatura	95°C	95°C	60°C
Tempo (mm:ss)	00:20	00:03	00:30
Nº ciclos	1	40	

Imediatamente a seguir a completar a reação de PCR em tempo real o equipamento realiza uma curva de dissociação dos produtos de PCR, aquecendo gradualmente a amostra de 60°C até 95°C com incrementos de 1% (0,35 °C) e leitura contínua de fluorescência.

2.5.2.3 – Primers Tryp18S2

No PCR em tempo real efetuado com sonda *Taqman*® foram utilizados *primers* desenvolvidos *in-house*, os *primers* Tryp18S2F (5'- GCG TGC GGT TTA ATT TGA CT - 3') e Tryp18S2R (5'- TGA CGG AAT CAA CCA AAC AA - 3') e a sonda Tryp18S2P (5' – FAM – ATG GTG GTG CAT GGC CGC TT – TAMRA – 3'). A sonda de hibridização Tryp18S2P utiliza uma metodologia de marcação com dois fluoróforos (FAM/TAMRA), explicada anteriormente (ver **1.5.2.1**). Para a mistura de reação foi utilizado um reagente comercial, o *Taqman*® *Fast Advanced Master Mix*, da *Applied Biosystems*™. A concentração dos diferentes reagentes não é revelada na bula, tendo apenas indicação que tem as quantidades otimizadas para um PCR em tempo real. Cada reação continha 2,5 µL de H₂O ultra-pura, autoclavada, 5 µL de *Taqman*® *Fast Advanced Master Mix*, 0,5 µL de cada um dos *primers* Tryp18S2F e Tryp18S2R (5 pmol) e 0,5µL de sonda Tryp18S2P (1 pmol), à qual eram adicionados 2 µL de amostra, perfazendo um volume final de 10µL. As condições de PCR em tempo real para esta experiência estão descritas na tabela seguinte (**Tabela 11**).

Tabela 11 - Condições de PCR em tempo real com sonda *Taqman*®

Fase	Pré-desnaturação	Desnaturação	Hibridização/Extensão
Temperatura	95°C	95°C	60°C
Tempo (mm:ss)	00:20	00:03	00:30
Nº ciclos	1	40	

2.5.3 - Desenvolvimento dos *primers in-house*

2.5.3.1 – Sequências de ADN

Para o desenvolvimento dos *primers* Tryp18SF, Tryp18SR, Tryp18S2F, Tryp18S2R e sonda Tryp18S2P recorreu-se ao alinhamento de 8 sequências de ADN que codificam para a subunidade 18S do ARN ribossomal de *Trypanosoma*, selecionados da base de dados do *National Center for Biotechnology Information* (NCBI). As sequências utilizadas foram de *T. brucei brucei* (NC_008409.1), *T. brucei gambiense* (AB301938.1), *T. brucei rhodesiense* (AB301939.1), *T. vivax* (DQ317416.1), *T. congolense riverine/forest-type* (U22319.1), *T. congolense savannah* (AJ009146.1), *T. evansi evansi* (AB551922.1) e *T. grayi* (AJ005278.1).

A especificidade dos *primers* foi verificada efetuando uma pesquisa BLAST® (acesso livre em <http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>) contra o genoma humano e genoma de rato (para representar ADN de mamífero como possível contaminante das amostras), e alinhamentos contra a região 18S de *Glossina palpalis* (AF322431.1) e contra os simbiossitos bacterianos de *Glossina* spp., nomeadamente *Wigglesworthia glossinidia* (NC_004344.2), *Sodalis glossinidius* (NC_007712.1) e *Wolbachia pipientis* (NC_002978.6), para excluir interferências de sequências originárias do vetor.

2.5.3.2 – Características funcionais dos *primers*

A sensibilidade dos *primers* Tryp18S e Tryp18S2 foi testada efetuando diluições seriadas de uma solução contendo ADN de *Trypanosoma brucei*, tendo a concentração de ADN na solução-mãe sido igualmente aferida através da utilização do equipamento *NanoDrop™ 1000 Spectrophotometer*.

A especificidade dos *primers* foi testada utilizando ADN de referência de *Leishmania infantum*, *Plasmodium falciparum*, *Leptospira interrogans*, *Borrelia burgdorferi*, *Entamoeba histolytica* e *Homo sapiens sapiens*.

A aplicabilidade da utilização dos *primers* Tryp18S2 para a quantificação do número de parasitas presentes por amostra foi determinada com recurso a três parâmetros, a saber a eficiência da reação, a variabilidade intra-ensaio e a variabilidade

inter-ensaio. A eficiência da reação foi calculada de acordo com a fórmula apresentada anteriormente (ver **Equação 1**). Na variabilidade intra-ensaio são analisadas, num mesmo ensaio, as réplicas de duplicados das diluições seriadas utilizadas na construção da curva-padrão de calibração. O coeficiente de variação para cada uma das diluições foi calculado pela seguinte equação (**Equação 2**):

$$\frac{\text{Média dos desvios} - \text{padrão dos duplicados}}{\text{Média dos duplicados}} \times 100$$

Equação 2 - Fórmula para cálculo da variabilidade intra-ensaio

Na variabilidade inter-ensaio, por sua vez, são avaliados os valores dos duplicados das diluições seriadas da curva padrão, obtidos em diferentes ensaios. O coeficiente de variação para cada uma das diluições foi calculado pela seguinte equação (**Equação 3**):

$$\frac{\text{Desvio} - \text{padrão da média dos duplicados}}{\text{Média dos duplicados}} \times 100$$

Equação 3 - Fórmula para cálculo da variabilidade inter-ensaio

Eficiências de amplificação superiores a 90% e coeficientes de variação intra-ensaio e inter-ensaio inferiores a 10% foram considerados resultados satisfatórios (Rolão 2004).

2.5.3.3 – Temperaturas de dissociação

Utilizando os *primers* Tryp18S com a metodologia *SYBR® Green I*, procedeu-se à definição das temperaturas de dissociação para cada uma das espécies de *Trypanosoma* que seria expectável estarem presentes nas amostras. Para tal recorreu-se ao programa *OligoCalc* (<http://www.basic.northwestern.edu/biotools/oligocalc.html>), onde, a partir da sequência de nucleótidos do produto amplificado para cada espécie é

calculado um valor esperado para a temperatura de dissociação. As sequências testadas foram as descritas no ponto **2.5.3.1**.

2.6 – Utilização de enzima de restrição

Através da análise das sequências de ADN resultantes de amplificação por PCR das diferentes espécies de *Trypanosoma* que seria expectável conseguir identificar com utilização dos *primers* Tryp18S, foi seleccionada uma enzima de restrição para digerir os produtos de PCR convencional, que permitia, após eletroforese em gel de agarose, diferenciar as espécies de tripanossoma.

2.6.1 – PCR convencional

2.6.1.1 – *Primers* Tryp18S

O PCR convencional efetuado com os *primers* Tryp18S, no âmbito da utilização da enzima de restrição, é em tudo semelhante ao descrito anteriormente (ver **2.5.1.1**). A única diferença reside na não realização de eletroforese com o produto resultante da reação de PCR convencional, por este seguir para digestão com a enzima de restrição.

2.6.2 – Restrição

2.6.2.1 – Enzima de restrição

A enzima de restrição utilizada foi a enzima *FastDigest®* TfiI (PfeI), da Fermentas®, que apresenta a seguinte zona de corte, sendo W = A ou T:



2.6.2.2 – Reação

Para cada reação foram adicionados 17 µL de H₂O ultra-pura, autoclavada, 2 µL de solução tampão *FastDigest® Green Buffer*, 0.5 µL de enzima de restrição *FastDigest®* TfiI e 10 µL de amostra (produto de PCR).

Posteriormente, no termociclador *Gene Pro*, da *Hangzhou Bioer Technology Co., Ltd*, as amostras foram colocadas durante 30 minutos a 37°C (temperatura ótima de actividade enzimática), seguido de 5 minutos a 65,5°C, para inativar a enzima.

Os produtos da digestão foram depois sujeitos a eletroforese em gel de agarose, como descrito anteriormente (ver **2.5.1.1**) com uma diferença, que reside no facto de o gel de agarose ter uma concentração de 3%.

2.6.2.3 – Perfil de restrição esperado

A tabela seguinte (**Tabela 12**) apresenta o produto esperado, após a digestão com enzima de restrição, para o ADN de cada uma das espécies de tripanossoma estudadas.

Tabela 12 - Produto esperado após restrição com enzima TfiI

Espécie	<i>T. brucei</i>	<i>T. congolense</i>	<i>T. vivax</i>	<i>T. grayi</i>
Nº p.b. produto	178	188	163	164
Nº locais de corte	1	1	1	2
Tamanho das bandas (p.b.)	120; 58	132; 56	108; 55	85; 56; 23

No caso de *T. brucei*, por exemplo, é então expectável que apareçam no gel duas bandas, uma com 120 p.b. e outra com 58 p.b. O mesmo raciocínio serve para as restantes espécies representadas, exceto para o caso especial de *T. grayi*, porque a enzima apresenta dois locais de corte. No caso de *T. grayi* é expectável que apareçam então três bandas, uma com 85 p.b., outra com 56 p.b. e outra com 23 p.b.

2.7 – Recurso a sequenciação de ADN

A sequenciação de ADN foi utilizada para confirmação da correta utilização das metodologias descritas anteriormente para identificação das espécies de tripanossomas.

2.7.1 – PCR convencional

2.7.1.1 – *Primers* Tryp18S

A reação de PCR convencional utilizando os *primers* Tryp18S é igual à descrita anteriormente (ver 2.5.1.1).

2.7.2 - Reação

2.7.2.1 – Purificação do ADN obtido

Os produtos de ADN obtidos após reação de PCR e consequente eletroforese em gel de agarose foram purificados para posterior sequenciação utilizando o *kit illustra™ GFX™ PCR DNA and Gel Band Purification Kit*, da *GE Healthcare™* (Buckinghamshire, UK), tendo sido seguidas todas as indicações do fabricante à exceção do volume final de eluição, que foi reduzido para 30 µL.

2.7.2.2 – Sequenciação propriamente dita

As reações de sequenciação foram realizadas pela empresa STAB VIDA®. Os produtos de PCR foram sequenciados em ambas as direções, com os *primers* Tryp18SF e Tryp18SR para fragmento do gene 18S.

2.8 – Análise estatística

2.8.1 – Relação entre número de moscas infetadas e o sexo das moscas

Para avaliar se o número de moscas infetadas da espécie *Glossina palpalis gambiensis* depende do sexo das moscas recorreu-se ao Teste do Qui-Quadrado de independência, implementado no *software* de análise estatística SPSS (v. 19; SPSS Inc,

Chicago, IL), como descrito por Maroco (2010). Considerou-se uma probabilidade de erro de tipo I (α) de 0,05 em todas as análises inferenciais.

2.8.2 – Relação entre a carga parasitária média e o sexo das moscas

A hipótese da carga parasitária média ser diferente consoante o sexo das moscas foi avaliada pelo teste não-paramétrico de Wilcoxon-Mann-Whitney. A análise estatística foi efetuada com o *software* de análise estatística SPSS (v. 19; SPSS Inc, Chicago, IL), para $\alpha = 0,05$, como descrito por Maroco (2010).

3 – Resultados

3.1 – Extração de ADN

Foi extraído com sucesso o ADN de 762 moscas da espécie *Glossina palpalis gambiensis*.

Foram realizadas, no total, 42 sessões de extração, cada uma com 20 amostras e um branco de extração, realizado nas mesmas condições, mas com H₂O ultra-pura em vez de material proveniente das glossinas. Aos brancos de extração foi depois efetuado PCR convencional com os *primers* GmTub (ver 2.5.1.1 e 2.5.1.2), que amplificam o gene da tubulina das glossinas. Todas estas reações de PCR com o branco de extração foram negativas, comprovando assim que não existiu contaminação cruzada entre as amostras.

3.2 – Determinação da concentração de ADN extraído

A todas as amostras foi efetuada a determinação da concentração e da pureza do ADN extraído.

As concentrações obtidas encontram-se entre 57,16 ng/μL e 63,29 ng/μL, num intervalo de confiança de 95%.

Os valores de pureza, obtidos através do cálculo do rácio entre as absorbâncias medidas a $\lambda = 260$ nm e $\lambda = 280$ nm, encontram-se entre 2,02 e 2,04, num intervalo de confiança de 95%.

3.3 – Preparação da solução-padrão de ADN para as reações de PCR em tempo real

Foi determinada a concentração de uma solução de ADN de *T. brucei brucei*, já existente no laboratório, através da utilização do equipamento *NanoDrop™ 1000 Spectrophotometer*, tendo sido obtido um valor de 50 ng/μL, com um grau de pureza de 1,79.

Tendo em conta este valor calculou-se o correspondente em número de parasitas, com o conhecimento de que o valor médio de ADN por parasita é de aproximadamente

0,1 pg/célula (Adams et al. 2006), chegando-se à conclusão que a solução continha ADN correspondente a 5×10^5 parasitas/ μ L. Adotou-se a terminologia “equivalente de parasita” por se calcular o número de parasitas a partir da quantidade de ADN parasitário presente em cada amostra.

A partir desta solução efetuaram-se depois diluições seriadas de 1:10, entre 10^5 e 0,1 equivalentes de parasita por reação, podendo assim obter uma curva de calibração que permitisse inferir quanto à quantidade de parasitas presentes.

3.4 – PCR em tempo real

3.4.1 – Desenvolvimento de PCR em tempo real para quantificação de ADN de *Trypanosoma* em *Glossina*

No âmbito deste trabalho foram desenvolvidas e estudadas duas metodologias de PCR em tempo real para a quantificação de *Trypanosoma*: a primeira com os *primers* Tryp18S e sistema *SYBR® Green I* e a segunda com os *primers* Tryp18S2 e sistema *Taqman®*, que obrigou também ao desenvolvimento da sonda Tryp18SP (ver 2.5.2).

A decisão sobre qual das metodologias seria utilizada ao longo do trabalho para a quantificação do ADN de *Trypanosoma* presente nas amostras recaiu sobre um estudo preliminar, onde foram efetuadas 6 réplicas, em duplicado, das diferentes soluções utilizadas como calibrador, nomeadamente com 10^5 , 10^4 , 10^3 , 10^2 , 10, 1 e 0,1 equivalentes de parasita (e.p.), com ambas as metodologias (**Gráfico 1** e **Gráfico 2**).

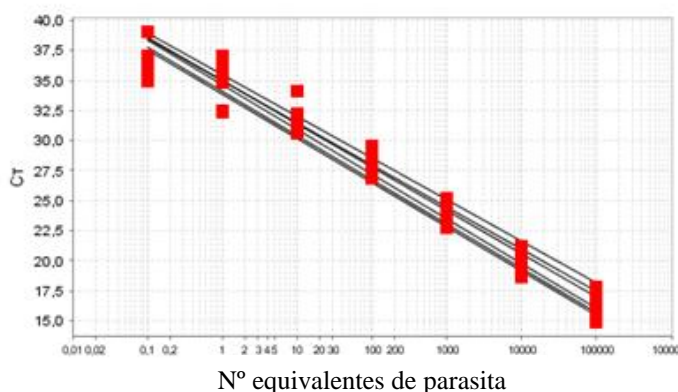


Gráfico 1 - Curva de calibração com *primers* Tryp18S e sistema *SYBR® Green I*.

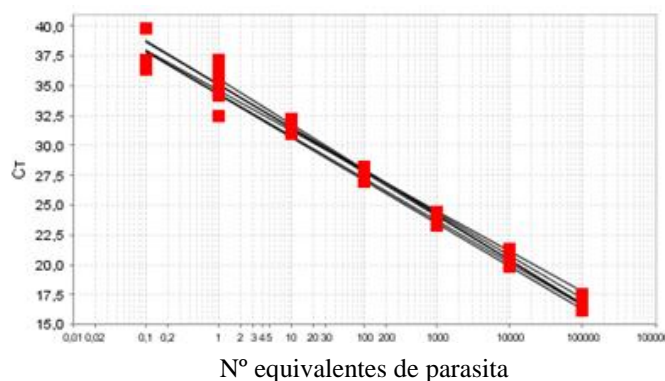


Gráfico 2 - Curva de calibração com *primers* Tryp18S2 e sistema *Taqman*®

Comparando os valores do coeficiente de correlação (R^2) e de eficiência da reação utilizando cada um dos métodos pode observar-se que estes parâmetros são muito semelhantes, sendo marginalmente superiores para os *primers* Tryp18S2 com o sistema *Taqman*® (Tabela 13).

Tabela 13 - Coeficiente de correlação e eficiência dos *primers* Tryp18S e Tryp18S2

Réplicas	Tryp18S		Tryp18S2	
	R^2	Eff. (%)	R^2	Eff. (%)
Réplica 1	0,984	87,445	0,997	98,169
Réplica 2	0,981	87,109	0,991	90,201
Réplica 3	0,980	94,387	0,997	89,56
Réplica 4	0,964	85,749	0,992	83,827
Réplica 5	0,969	92,625	0,976	91,569
Réplica 6	0,989	89,614	0,991	87,265
Média	0,978	89,488	0,991	90,099

Neste estudo preliminar foi ainda possível observar que o sistema *SYBR*® *Green I* apresenta sinal de fluorescência nos controlos negativos, ao contrário do que acontece com o sistema *Taqman*® (página seguinte, Gráfico 3).

Por estes motivos, selecionaram-se os *primers* Tryp18S2 no sistema *Taqman*® para efetuar a quantificação do ADN do parasita, tendo em seguida sido efetuados os diversos parâmetros necessários à validação do método, nomeadamente a determinação

da sensibilidade e especificidade dos *primers*, a variabilidade intra-ensaio e a variabilidade inter-ensaio.

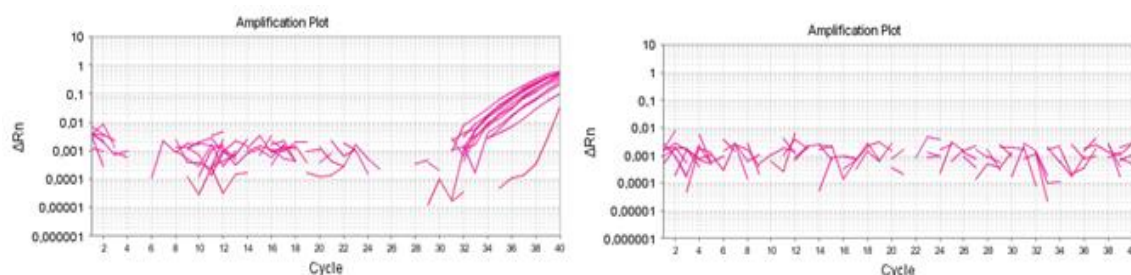


Gráfico 3 - Gráfico de amplificação do controlo negativo em ambos os sistemas

À esquerda apresenta-se o gráfico correspondente à amplificação do controlo negativo obtida com *primers* Tryp18S e metodologia SYBR® Green I; à direita apresenta-se o gráfico correspondente à amplificação do controlo negativo obtida com *primers* Tryp18S2 e metodologia Taqman®.

3.4.1.1 – Sensibilidade dos *primers* Tryp18S2

No estudo preliminar efetuados com os *primers* Tryp18S2, explicado no ponto anterior, foram testadas soluções-padrão de calibração, diluídas 1:10, de 10^5 a 0,1 equivalentes de parasita, sendo que destes calibradores foram efetuadas 6 réplicas, em duplicado.

Para testar a sensibilidade consideraram-se aceitáveis os níveis de calibrador em que, em primeiro lugar, existisse efetivamente amplificação de ADN, e em segundo lugar, que apresentassem um valor de desvio-padrão entre os dois Ct dos duplicados inferior a 0,5.

As diferentes diluições apresentaram resultados aceitáveis até à diluição equivalente a 1 parasita. Na diluição correspondente a 0,1 e.p., das 6 réplicas, apenas uma apresentou amplificação, e mesmo esta apresentou um desvio-padrão de 1,99 Ct. O gráfico apresentado na página seguinte (**Gráfico 4**) apresenta as curvas de amplificação correspondentes a esta réplica. Note-se que as curvas correspondentes à amplificação do ADN com 0,1 e.p. (linhas roxas, do lado direito do gráfico) estão bastante afastadas, com afastamento maior que nos restantes duplicados, correspondendo assim ao desvio-padrão anteriormente referido.

Por este motivo, ficou estabelecido que a sensibilidade destes *primers* é de 1 equivalente de parasita, sendo também este valor o ponto de corte entre as amostras consideradas positivas e as amostras consideradas negativas no restante estudo.

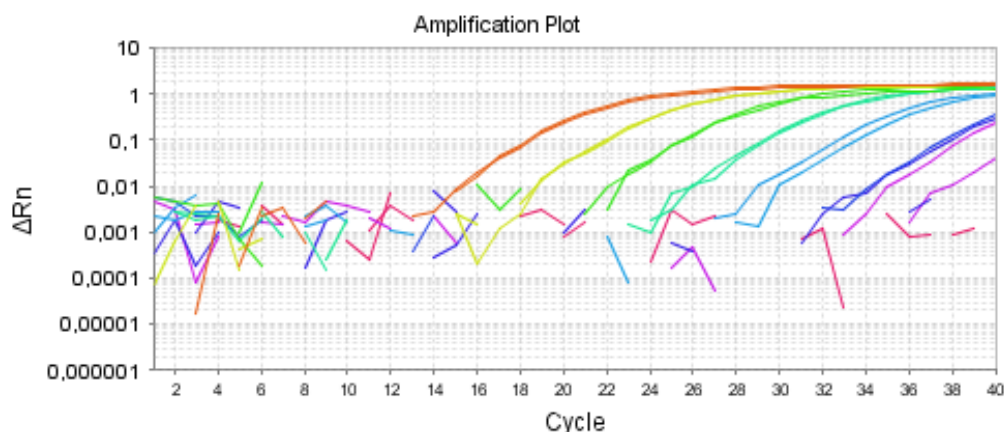


Gráfico 4 - Exemplo de curva de amplificação das réplicas do estudo de variabilidade intra-ensaio dos *primers* Tryp18S2. Legenda: **vermelho** – 10^5 equivalentes de parasita; **amarelo** – 10^4 equivalentes de parasita; **verde** – 10^3 equivalentes de parasita; **azul esverdeado** – 10^2 equivalentes de parasita; **azul claro** – 10 equivalentes de parasita; **azul escuro** – 1 equivalentes de parasita; **roxo** – 0,1 equivalente de parasita; **rosa** – controlo negativo.

3.4.1.2 – Especificidade dos *primers* Tryp18S2

A especificidade deste par de *primers* foi avaliada em duas fases.

Na primeira fase, em que se comparou a sequência dos *primers* com as diferentes sequências referidas no ponto 2.5.3.1, não se encontraram correspondências, ou seja, sequências de ADN onde os *primers* poderiam ligar-se, em nenhum dos casos, excluindo assim a possibilidade de amplificação inespecífica de ADN de mamífero, de *Glossina palpalis* e dos diversos simbiontes da mosca.

A segunda fase foi efetuada já com o método *Taqman*®, e consistiu em realizar PCR em tempo real com ADN de referência das diferentes espécies apresentadas no ponto 2.5.3.2.

Como se pode observar no gráfico da página seguinte (**Gráfico 5**), existiu amplificação tanto para *T. brucei* como para *L. infantum*. O sinal correspondente ao ADN humano apresentou sinal de fluorescência menor que o sinal correspondente ao controlo negativo, pelo que não foi considerado relevante.

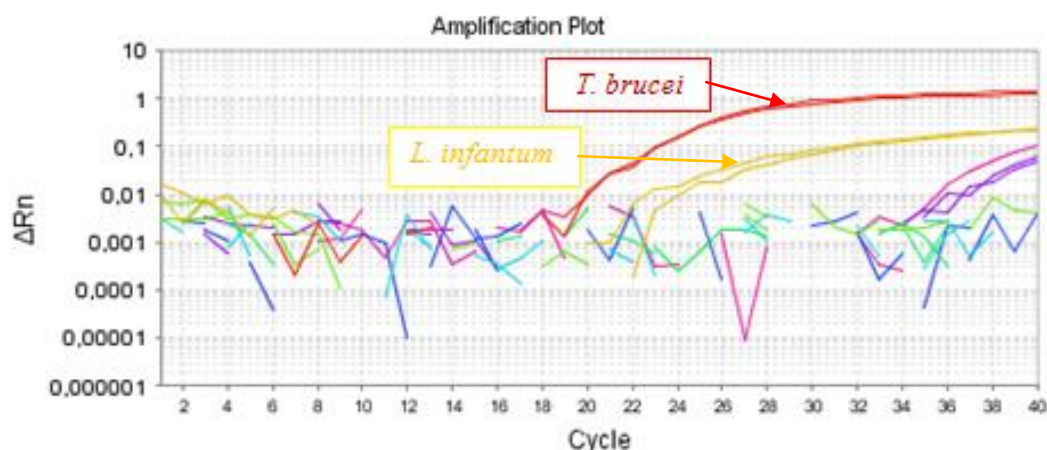


Gráfico 5 – PCR em tempo real para avaliação da especificidade do par de *primers* Tryp18S2 *T. brucei* - vermelho; *Leishmania infantum* – amarelo; *Plasmodium falciparum* – verde claro; *Leptospira interrogans* – verde escuro; *Borrelia burgdorferi* – azul claro; *Entamoeba histolytica* – azul escuro; *Homo sapiens sapiens* – roxo; Controlo negativo (H₂O) – rosa.

3.4.1.3 – Estudo de variabilidade intra-ensaio dos *primers* Tryp18S2

A variabilidade intra-ensaio foi avaliada numa placa com organização idêntica à descrita anteriormente para o estudo preliminar (ver 3.4.1), e calculada segundo a **Equação 2**. Os resultados obtidos estão descritos na tabela seguinte (**Tabela 14**).

Como se pode observar, o valor do coeficiente de variação intra-ensaio encontra-se, em todos os níveis de calibrador, e em todas as seis réplicas, dentro dos valores que haviam sido estabelecidos anteriormente como satisfatórios (ou seja, inferior a 10%).

Tabela 14 - Determinação da variabilidade intra-ensaio

Quantidade	Desvio-padrão	Ct	Coeficiente de variação intra-ensaio (%)
100000	0,139090223	16,52179035	0,84
10000	0,070732078	19,93871689	0,35
1000	0,126819979	24,11909103	0,53
100	0,121186013	27,8760341	0,43
10	0,235049266	31,75633367	0,74
1	1,04035635	35,7519563	2,91

3.4.1.4 – Estudo da variabilidade inter-ensaio dos *primers* Tryp18S2

Ao longo de todo o trabalho, foram sendo utilizadas diversas placas com 96 poços para as reações de PCR em tempo real com estes *primers*, sendo que em cada uma destas placas foi efetuada uma curva de calibração, em duplicado. Com os valores obtidos nos diversos pontos de calibração, foi aplicada a **Equação 3** para o cálculo da variabilidade inter-ensaio (**Tabela 15**). Estes valores encontram-se também dentro dos parâmetros definidos como aceitáveis no âmbito deste trabalho (inferior a 10%).

Tabela 15 – Determinação da variabilidade inter-ensaio

Quantidade	Desvio-padrão	Ct	Coefficiente de variação inter-ensaio (%)
100000	0,589208	17,43883	3,38
10000	0,763007	20,86748	3,66
1000	0,624653	24,59929	2,54
100	0,676949	28,26825	2,39
10	0,784235	32,14253	2,44
1	0,618276	35,59719	1,74

3.4.2 – Desenvolvimento de PCR em tempo real para identificação de espécies de *Trypanosoma*

Apesar da escolha da metodologia a utilizar para a quantificação de ADN parasitário ter recaído no par de *primers* Tryp18S2 com sonda *Taqman*®, foi tomada a decisão de aproveitar a capacidade da metodologia de *SYBR*® *Green I* de efetuar curvas de dissociação dos produtos de ADN para diferenciar entre as espécies de *Trypanosoma*.

3.4.2.1 – Determinação das temperaturas de dissociação específicas

Para determinar se as temperaturas de dissociação dos produtos de ADN das diferentes espécies de *Glossina* eram diferentes ao ponto de serem discriminantes, foram comparados os produtos de ADN esperados da reação de PCR quanto ao tamanho e à temperatura prevista de dissociação, com base nas diferentes sequências de

nucleótidos, sendo que para tal se recorreu ao programa *OligoCalc*. Os resultados obtidos estão apresentados na tabela seguinte (**Tabela 16**). As sequências de nucleótidos a partir das quais se efetuou este estudo foram as descritas no ponto **2.5.3.1**.

Como se pode observar, as diferentes espécies do parasita apresentam temperaturas de dissociação diferentes, podendo assim ser discriminadas com base neste fator. É de notar, contudo, que as temperaturas de dissociação ao nível subespecífico de *T. brucei* são iguais, pelo que não é possível distinguir entre as três subespécies.

Tabela 16 - Tamanho do produto amplificado com *primers* Tryp18S e temperaturas de dissociação teóricas obtidas com o programa *OligoCalc*

Espécie	Nº pares de bases	Temperatura dissociação
<i>T. brucei brucei</i>	178	80,73 °C
<i>T. brucei gambiense</i>	178	80,73 °C
<i>T. brucei rhodesiense</i>	178	80,73 °C
<i>T. congolense</i>	188	82,55 °C
<i>T. vivax</i>	163	84,25 °C
<i>T. grayi</i>	164	79,34 °C

O gráfico que se apresenta na página seguinte (**Gráfico 6**) é obtido através do *software* do equipamento 7500 Fast Real Time PCR System, da Applied Biosystems™, onde se podem ver as curvas de dissociação das 4 espécies encontradas no decurso deste trabalho, obtidas a partir das amostras testadas.

Como se pode observar, as temperaturas de dissociação obtidas são semelhantes às calculadas com recurso ao programa *OligoCalc* (*T. grayi* – aprox. 79,0 °C; *T. brucei* – aprox. 80,8 °C; *T. congolense* – aprox. 82,5 °C; *T. vivax* – aprox. 85,2 °C), podendo por isso afirmar-se que os dados obtidos pelo programa foram fiáveis e coerentes com os obtidos na experiência.

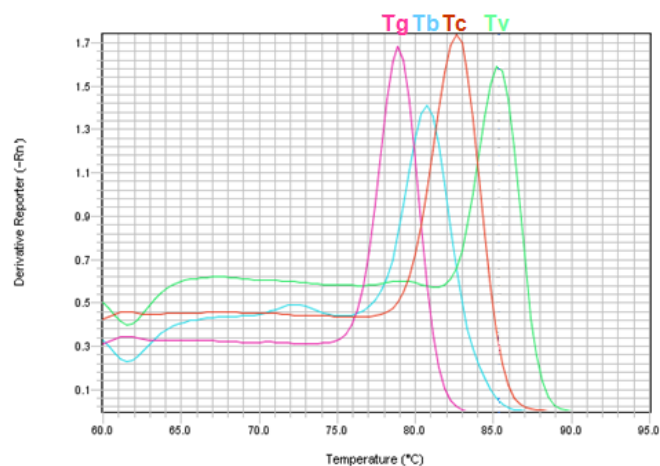


Gráfico 6 - Curvas de dissociação das diferentes espécies *T. grayi* – linha de cor **rosa**, Tg; *T. brucei* – linha de cor **azul**, Tb; *T. congolense* – linha de cor **castanha**, Tc; *T. vivax* – linha de cor **verde**, Tv.

3.4.2.2 – Identificação de produtos inespecíficos

O estabelecimento das temperaturas de dissociação correspondentes a cada uma das espécies possibilitou a identificação, nas curvas de dissociação, de produtos de amplificação inespecíficos, por apresentarem valores de temperatura menores do que obtidos para as diferentes espécies, tal como é visível no próximo gráfico (**Gráfico 7**). Na curva em questão, pode observar-se que a amostra apresenta uma temperatura de dissociação específica, atribuível a *T. grayi* (aprox. 78,5 °C), e uma temperatura de dissociação inespecífica (aprox. 72 °C).

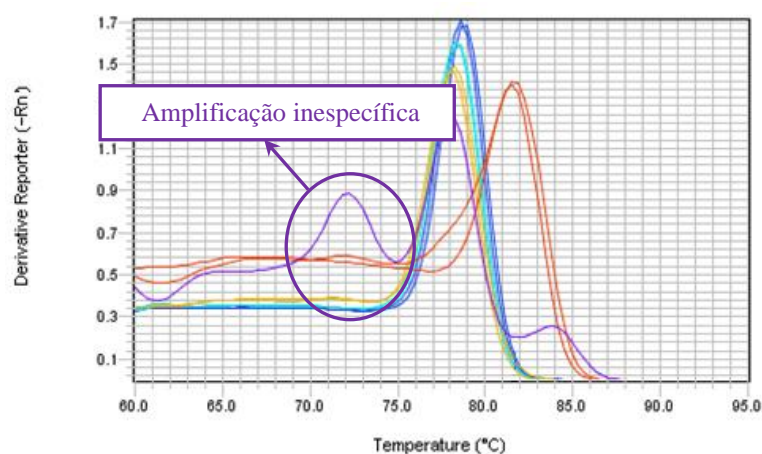


Gráfico 7 - Exemplo de curvas de dissociação no sistema SYBR® Green I. Amplificações específicas (temperaturas de dissociação = $\pm 79^{\circ}\text{C}$ e $\pm 82^{\circ}\text{C}$) e amplificação inespecífica (temperatura de dissociação = $\pm 72^{\circ}\text{C}$).

Numa tentativa de esclarecer a origem desta banda inespecífica, foi efetuado um PCR convencional, com *primers* Tryp18S, a uma amostra de mosca *Glossina morsitans morsitans*, não infetada, mantida no Insetário do Instituto de Higiene e Medicina Tropical (**Gráfico 8**). Comprovou-se assim que existe efetivamente amplificação de ADN de glossina, e que este mesmo ADN apresenta uma curva de dissociação bem definida, com uma temperatura de aproximadamente 73,7 °C, o que permite que seja bem distinguida das restantes curvas, definidas para os tripanossomas estudados.

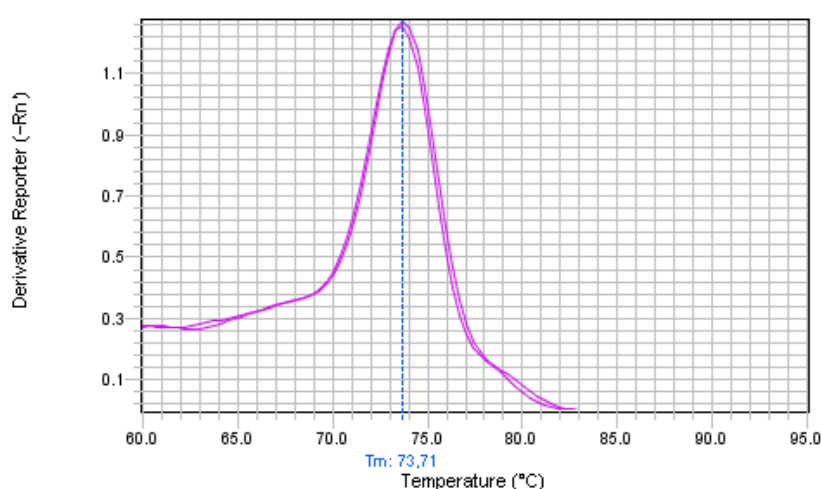


Gráfico 8 – Curva de dissociação de uma amostra não infetada de *Glossina morsitans*

3.5 – PCR-RFLP

3.5.1 – Desenvolvimento de método PCR-RFLP para identificação de espécies de *Trypanosoma*

Como já foi descrito no ponto **2.6.2**, foi desenvolvida uma técnica de identificação de espécies de *Trypanosoma* com recurso ao método PCR-RFLP, utilizando os *primers* Tryp18S e a enzima de restrição *FastDigest®* TfiI (PfeI).

3.5.1.1 – Local de corte da enzima de restrição

A escolha desta enzima recaiu na sua capacidade de cortar a sequência de nucleótidos do produto de PCR em locais que formassem cadeias que posteriormente

permitissem distinguir entre as diferentes espécies de *Trypanosoma* estudadas. Para tal foram estudadas as sequências das diversas espécies, com os resultados expostos na tabela seguinte (**Tabela 17**).

Tabela 17 - Sequências de ADN amplificado dos genes 18S das diferentes espécies de Trypanosoma, e tamanho esperado do produto de PCR após digestão com enzima Tfil

Espécie	Sequência (5' – 3')	Produto esperado (p.b.)
<i>T. brucei</i>	<u>GAGATCCAAGCTGCCCAGTAGGTGCCGGGATTGTCCACACAGG</u> ACAGCAGTCCCTCCGGCGGGGATTTTTTCCCAACGGTGGTTCGT CATCCTTCTTTTACAGGCCCTTCTCTGCGG G↓ATTG CTTGCTTT <u>TCGCGCAAGGTGAGATTTTGGGCAACAGCAGGTCTGTGATGCTC</u> <u>CT</u>	58 120
<i>T. vivax</i>	<u>GAGATCCAGGCCGCCAGTAGGCCCCAGGATCACGCACAGGAC</u> AGCAGCACGGTGGCGGGCCCTCGGGCCCAACGCCGTCCGCATC CGGTGCGGGCCTTCTCTGCGG G↓ATTG CTTGACGCGCAAGGTG <u>AGATGCTGGGCAACAGCAGGTCTGTGATGCTCCT</u>	55 108
<i>T. grayi</i>	<u>TGAGATCCAAGCTGCCCAGTAG</u> G↓ATTG AGAATTGCCCATAGGA TAGCAATCCCTTCCGCGGGTTTTACCAAGGGGGGCGGTATTC GTTTGTATCCTTCTCTGCGG G↓ATTG CTTGTTTTGCGCAAGGTGA <u>GATTTTGGGCAACAGCAGGTCTGTGATGCTCCT</u>	23 56 85
<i>T. congolense</i>	<u>GAGATCCAAGCTGCCCAGTAGGGCCCGTGATTGTCCACACAGG</u> ACAGCCTACCGTCGTGGGCACGGTGTGCTCCTTCCGGGGTATCT CGGTGTTCCATGGCGGCGCTATCACACGGGGTCCTTCTCTGCGG G↓ATTG CTTGCCCCGCGCAAGGTGAGATTTTGGGCAACAGCAGG <u>TCTGTGATGCTCCT</u>	56 132

A sublinhado estão as sequências do ADN onde se ligam os *primers* Tryp18S. Com fundo preto e letras brancas estão as sequências de ADN onde atua a enzima Tfil, com local exato de corte identificado por “↓”.

Como se pode ver, todas as sequências apresentam locais de corte com esta enzima, e todos os produtos esperados apresentam pelo menos uma banda específica, permitindo assim distinguir entre as diferentes espécies.

3.5.1.2 – Sensibilidade da técnica PCR-RFLP

Uma vez que a técnica de PCR-RFLP implica a realização de um PCR convencional com *primers* Tryp18S, para posterior digestão com enzima, a sensibilidade da mesma foi testada utilizando soluções-padrão de calibração, diluídas 1:10, de 10^5 a 0,1 equivalentes de parasita (**Figura 10**).



Figura 10 - Estudo de sensibilidade da técnica de PCR-RFLP com primers Tryp18S. Legenda: M – ladder de ADN; 1 – 105 e.p.; 2 – 104 e.p.; 3 – 103 e.p.; 4 – 102 e.p.; 5 – 10 e.p.; 6 – 1 e.p.; 7 – 0.1 e.p.

Como se pode observar, apenas são visíveis bandas até à diluição correspondente a 10 equivalentes de parasita, sendo então este o limite da sensibilidade destes *primers*, quando utilizados em metodologias de PCR convencional.

3.5.1.3 – Perfil de restrição em gel de agarose

O perfil obtido após eletroforese em gel de agarose está de acordo com o esperado para todas as espécies, com exceção do *T. grayi* que, para além das bandas previstas apresenta duas bandas, uma com aproximadamente 110 pares de bases e outra

com aproximadamente 140 pares de bases. A imagem seguinte foi obtida de um gel de agarose, onde estavam presentes as quatro espécies esperadas, confirmadas posteriormente por sequenciação (**Figura 11**).

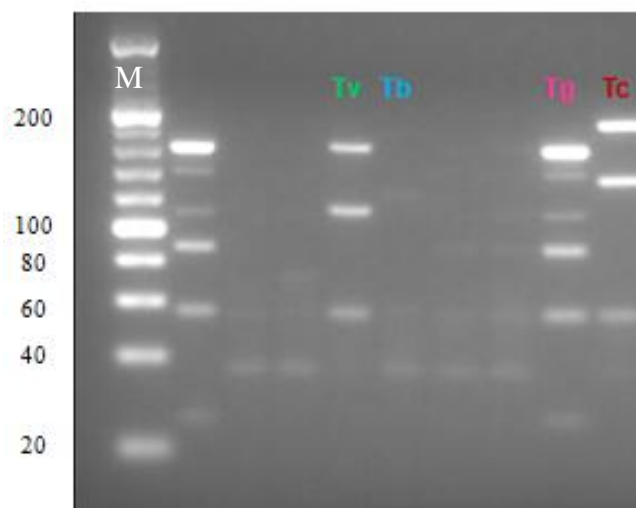


Figura 11 - Exemplo de gel de agarose com produtos de PCR após restrição com enzima Tfil. M – ladder de ADN MassRuler™, espaçamentos de 20 p.b. (Fermentas); Tv – *T. vivax*; Tb – *T. brucei*; Tg – *T. grayi*; Tc – *T. congolense*.

Como se pode observar, são visíveis seis bandas na linha correspondente a *T. grayi*, 5 bandas de produto da restrição e uma banda correspondente a produto no qual não ocorreu restrição, correspondente portanto à totalidade do produto obtido por PCR.

Todas as outras espécies apresentam esta última banda, que é suficientemente diferente para permitir a discriminação entre *T. brucei* (178 p.b.), *T. congolense* (188 p.b.) e *T. vivax*/*T. grayi* (163/ 164 p.b., respetivamente), o que acaba por contribuir também para a diferenciação entre elas. As únicas espécies que cujo produto total não é suficientemente diferente para ser distinguido com estas condições de eletroforese são *T. grayi* e *T. vivax*, mas o restante padrão de restrição permite esta distinção.

3.5.1.4 – Avaliação da possibilidade de infecção cruzada com *Leishmania* spp.

Como já foi anteriormente referido (ver 3.4.1.2), os *primers* Tryp18S2 apresentaram, no estudo de especificidade, reação cruzada com *Leishmania* spp. Com esta informação, foi efetuada pesquisa na base de dados do NCBI pela sequência do gene 18S de *Leishmania major* (GQ332361.1), espécie do parasita existente na RGB (WHO Expert Committee on the Control of Leishmaniases 2010).

Foi avaliada a capacidade teórica de hibridização dos *primers* Tryp18S, utilizados no âmbito deste trabalho para identificação dos parasitas infetantes das glossinas em metodologias de PCR em tempo real, como foi descrito, e de PCR-RFLP (ver 3.5). Os resultados estão expostos na tabela seguinte (**Tabela 18**).

Tabela 18 - Sequência do gene 18S de *Leishmania major*

Espécie	Sequência (5' – 3')	Produto esperado (p.b.)
<i>L. major</i>	<u>GAGATCCAAGCTGCCCAGTAGAATTCAGAATTGCCCATAGAATA</u>	
	GCAAACATCATCGGCGGGTTTTACCCAACGGTGGGCCGCATTCGGT	58
	CGAATTCCTTCTCTGCGG↓ATTCCTTTGTAATTGCACAAGGTGAA	107
	ATTTTGGGCAACAGCAGGTCTGTGATGCTCCT	

A sublinhado estão as sequências do ADN onde se ligam os *primers* Tryp18S. Com fundo preto e letras brancas estão as sequências de ADN onde atua a enzima Tfil, com local exato de corte identificado por “↓”.

Como se pode observar, os *primers* 18S amplificam esta zona do gene 18S de *Leishmania major*, e os fragmentos de ADN obtidos após restrição com enzima Tfil são semelhantes aos obtidos para *T. vivax* (ver **Tabela 17**).

Nesse sentido, a todas as amostras com identificação conclusiva de *T. vivax* após PCR-RFLP foi efetuado um PCR convencional específico para *Leishmania* spp. (ver **Figura 12**, na página seguinte).



Figura 12 - Eletroforese do ADN amplificado com *primers* MC1/MC2. Legenda: **1** – 21.6 M; **2** – 23B.1 F; **3** – 61.8 F; **4** – 29.8 M; **5** – 30.4 F; **6** – 30.8 F; **7** – 52.3 F; **8** – 50.5 M; **9** – 56.8 M; **10** – 71.4 M; **11** – 61.9 F; **12** – 74.13 M; **13** – 83A.8 M; **14** – 84.2 F; **15** – 86.10 M; **16** – 84.4 F; **17** – 90.16 M; **18** – Controlo *T. brucei*; **N** – Controlo negativo; **P** – Controlo positivo; **M** – *ladder* de ADN

Todas as reações de PCR apresentaram resultado negativo, contribuindo assim para a rejeição da hipótese de contaminação cruzada com ADN deste parasita, e permitindo a identificação conclusiva destas amostras como infetadas com *T. vivax*.

3.6 – Aplicação à amostra em estudo

Depois de devidamente desenvolvidos, partiu-se para a aplicação destes métodos ao estudo da amostra de moscas da espécie *Glossina palpalis gambiensis* capturadas na República da Guiné-Bissau.

3.6.1 – Infecção de *Glossina palpalis gambiensis* na RGB

3.6.1.1 – Número de glossinas infetadas

Para a determinação do número de glossinas infetadas por tripanossomas recorreu-se ao critério anteriormente estabelecido para se considerar uma amostra como positiva, ou seja, estar infetada por um número maior ou igual a 1 de equivalentes de tripanossoma, utilizando *primers* Tryp18S2 e metodologia Taqman® (Tabela 19).

Tabela 19 - Número e percentagem de amostras positivas

Região	Glossinas infetadas	Glossinas não infetadas	Percentagem glossinas infetadas
Biombo	84	162	34,1 %
Tombali	110	139	44,2 %
Bolama-Bijagós	34	140	19,5 %
Gabú	13	80	14,0 %
Total	241	521	31,6 %

Tombali, para além de ser a região da RGB com o maior número de *Glossina palpalis gambiensis* capturadas ($139 + 110 = 249$), é também aquela que apresenta uma maior percentagem de moscas infetadas. Em contraste, a região de Gabú foi aquela onde foram capturadas menos glossinas ($80 + 13 = 93$), e é também aquela que apresenta menor percentagem de amostras positivas.

3.6.1.2 – Número de glossinas infetadas, por sexo

Observou-se um maior número de glossinas infetadas do sexo masculino ($N = 133$) comparativamente às glossinas do sexo feminino ($N = 108$) (ver **Gráfico 9**).

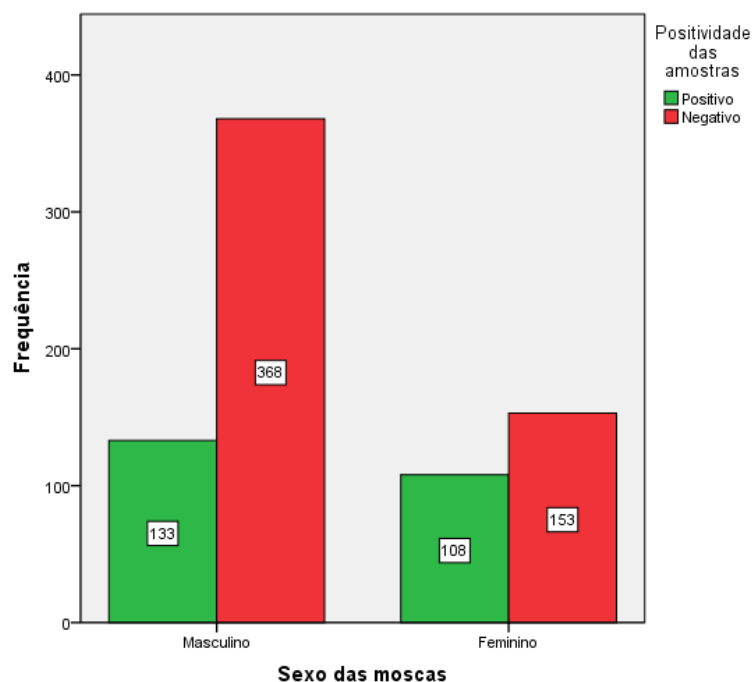


Gráfico 9 - Distribuição do número de glossinas positivas e negativas, por sexo

A positividade das amostras, ou seja, a infecção por tripanossomas, é dependente do fator sexo, sendo maior para as fêmeas.

A percentagem de glossinas infetadas do sexo feminino é de 41,3% (N = 261) e a percentagem de glossinas infetadas do sexo masculino é de 26,5% (N = 501). A análise estatística inferencial permite afirmar que a positividade das amostras é dependente do sexo das glossinas ($\chi^2(2) = 17,458$; $p = 0,000$; N = 762), sendo assim maior nas fêmeas. Em anexo (**Anexo I**) apresentam-se os *outputs* do SPSS para o teste do Qui-Quadrado de independência.

3.6.1.3 – Carga parasitária média, por sexo do vetor

As diferenças observadas entre a carga parasitária média em moscas do sexo masculino e a carga parasitária média em moscas do sexo feminino não foram estatisticamente significativas (U = 5790,5; W = 14046,5; $p = 0,112$). Em anexo (**Anexo II**) apresentam-se os *outputs* do SPSS para o teste de Wilcoxon-Mann-Whitney.

3.6.1.4 – Número de glossinas infetadas, de ambos os sexos, por espécie de tripanossoma

Observou-se uma maior número de fêmeas infetadas com *T. congolense* que de machos, sendo que esta diferença na proporção não é observada em infecções provocadas nem por *T. vivax* nem por *T. grayi* (ver **Gráfico 10**).

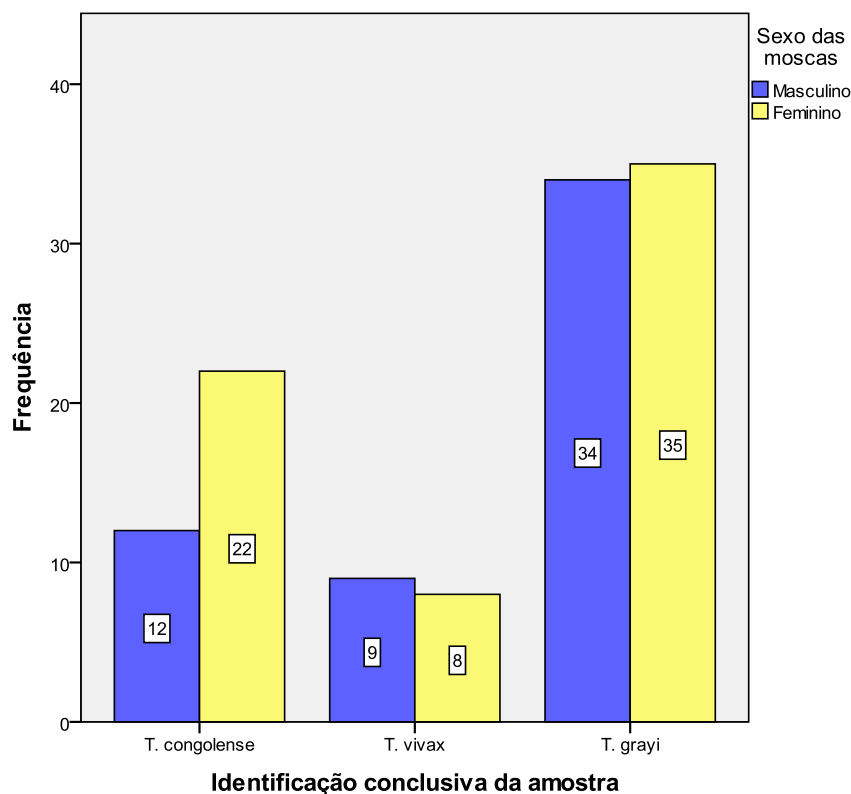


Gráfico 10 - Número de glossinas infetadas por espécie de tripanossoma

Nas infecções provocadas por *T. congolense*, a percentagem de fêmeas infetadas é superior (65 %) que a percentagem de machos infetados (35 %). Esta diferença não é observada nas outras duas espécies consideradas. Em infecções provocadas por *T. vivax*, 53 % das moscas infetadas é do sexo masculino e 47 % das moscas infetadas é do sexo feminino, e em infecções provocadas por *T. grayi*, 49 % das moscas infetadas é do sexo masculino, para 51 % das moscas do sexo feminino. Nesta análise não foram incluídas as moscas infetadas por *T. brucei brucei*, por estarem presentes na amostra em número muito reduzido (N = 2).

3.6.2 – Identificação de espécies de *Trypanosoma*

3.6.2.1 – Identificação preliminar por PCR em tempo real, *SYBR® Green I*

Como já foi referido, em todos os casos considerados como positivos com a quantificação por PCR em tempo real com sonda *Taqman®* prosseguiu-se para a identificação das espécies de tripanossomas infetantes através da análise de curvas de dissociação, de acordo com os critérios estabelecidos em 3.4.2.

Os resultados obtidos estão expostos no gráfico seguinte (**Gráfico 11**).

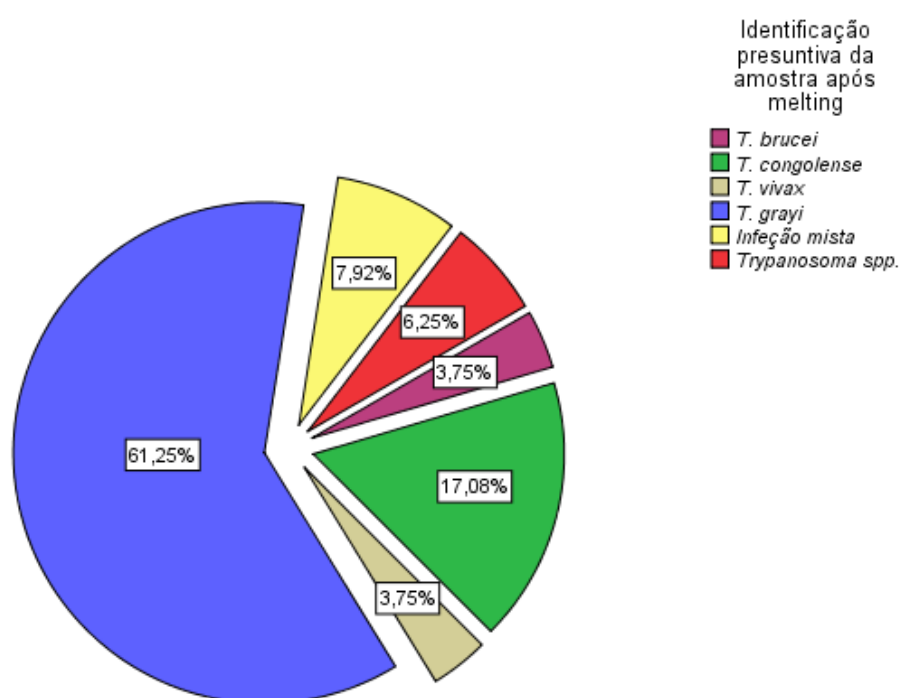


Gráfico 11 - Identificação presuntiva após análise das curvas de dissociação (*SYBR® Green I*)

Como se pode ver, com esta identificação preliminar mais de metade das amostras positivas mostrava estar infetada com *T. grayi* (N = 147), sendo a infeção com *T. congolense* a segunda mais representada (N = 41). As infeções causadas por *T. brucei* e por *T. vivax* estavam presentes no mesmo número de glossinas (N = 9 para cada uma das espécies). As amostras foram consideradas *Trypanosoma spp.* (N = 15) se apresentassem curvas de dissociação que não fossem coerentes com os valores de temperatura definidos anteriormente para cada uma das espécies (ver **Tabela 16**). A

tabela seguinte (**Tabela 20**) apresenta as identificações das amostras consideradas *Trypanosoma* spp. após esta fase da investigação.

Tabela 20 - Identificação das amostras consideradas *Trypanosoma* spp. após análise das curvas de dissociação

Identificação por temperatura de dissociação	N	Identificação
<i>Trypanosoma</i> spp.	15	18.4 M; 23A.4 F; 23A.5 F; 23A.11 M; 28.9 F; 28.14 F; 29.5 F; 29.12 M; 29.18 M; 31.4 F; 52.14 M; 52.17 M; 57.3 F; 69.10 M; 69.11 M

Todas as amostras assim identificadas apresentaram quantificações, com sonda *Taqman*®, inferiores a 3 equivalentes de parasita (**Gráfico 12**).

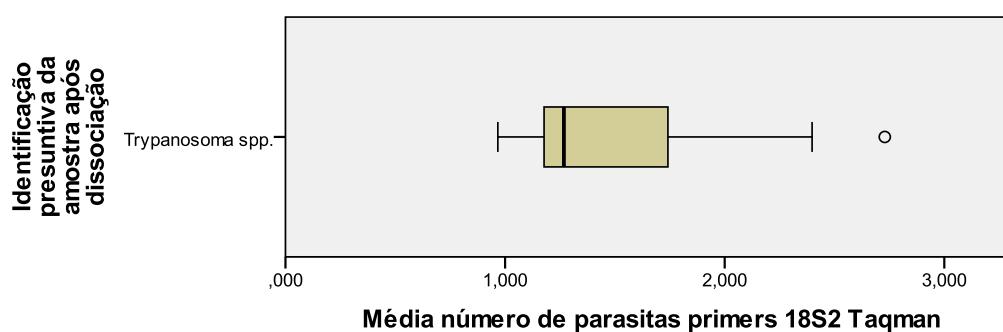


Gráfico 12 – Caixa de bigodes mostrando a distribuição do número de parasitas nas amostras consideradas *Trypanosoma* spp. após análise das curvas de dissociação (primers Tryp18S)

As amostras foram consideradas como apresentando infecções mistas (N = 19) quando apresentassem mais que um pico de temperatura de dissociação, cujos valores fossem coerentes com os estabelecidos, expostos na **Tabela 16**.

A tabela apresentada na página seguinte apresenta as identificações das amostras consideradas como estando infetadas por mais que uma espécie de *Trypanosoma*, e especifica quais as espécies infetantes (**Tabela 21**, página seguinte). Apenas foram identificadas, nesta fase, dois tipos de infecção mista, o primeiro de *T. grayi* com *T. vivax* (11 amostras) e o segundo de *T. grayi* com *T. congolense* (8 amostras).

Tabela 21 - Identificação preliminar das amostras com infecção mista após análise das curvas de dissociação (SYBR® Green I)

Tipo de infecção mista	N	Identificação
<i>T. grayi</i> + <i>T. vivax</i>	11	22.7 M; 25.9 M; 28.7 F; 54.3 F; 54.6 M; 74.13 M; 84.4 M; 88.6 M; 90.1 F; 90.7 F; 90.16 M
<i>T. grayi</i> + <i>T. congolense</i>	8	45.10 M; 46.3 F; 47.2 F; 47.8 M; 49.6 M; 49.7 M; 51.3 F; 68.15 M;

3.6.2.2 – Identificação conclusiva após PCR-RFLP

No âmbito deste trabalho, a identificação conclusiva das amostras apenas foi estabelecida após ter sido efetuado o método de PCR-RFLP a todas as amostras consideradas positivas com sonda *Taqman*®, de acordo com os critérios estabelecidos em 3.5.1. Os resultados obtidos estão expostos no gráfico seguinte (**Gráfico 13**).

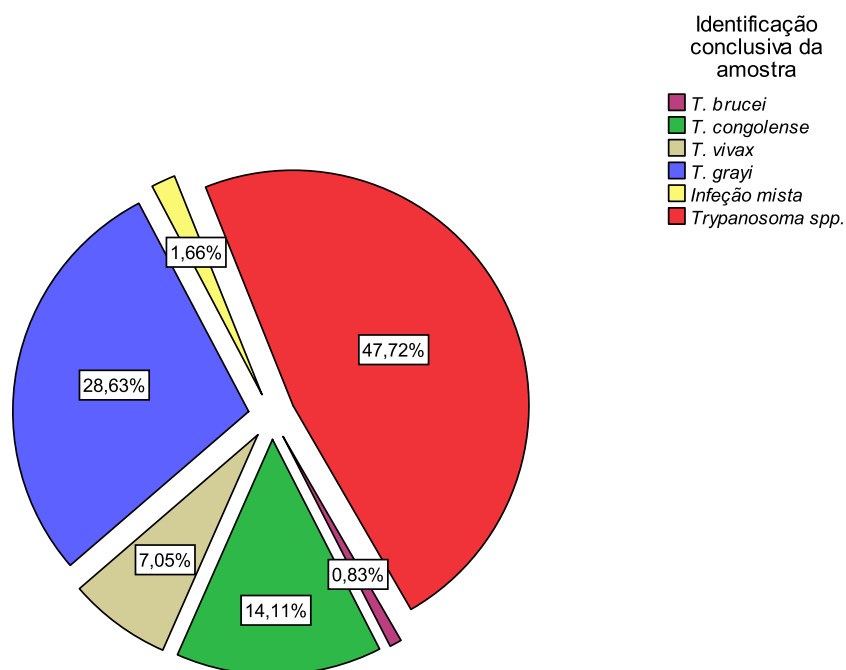


Gráfico 13 - Identificação conclusiva das amostras, em todas as áreas estudadas da RGB

Como se pode ver, e comparando este gráfico com o **Gráfico 11**, referente às identificações após análise das curvas de dissociação utilizando *primers* Tryp18S e metodologia *SYBR® Green I*, houve alterações na representatividade de cada um dos grupos. A porção maioritária das amostras foram consideradas como sendo *Trypanosoma* spp. (N = 115) em relação à espécie presente, sendo seguida da porção correspondente a infecção por *T. grayi* (N = 69), por *T. congolense* (N = 34), *T. vivax* (N = 17), infecções mistas (N = 4) e finalmente *T. brucei* (N = 2).

As amostras foram consideradas *Trypanosoma* spp. quando não foi possível a observação de bandas no gel de agarose, e infecções mistas quando se observasse inequivocamente a presença de dois padrões de restrição distintos numa mesma amostra. Relativamente às infecções mistas, de acordo com os resultados, houve uma diminuição de cerca de 79% dos casos considerados como infecções mistas (N = 19 → N = 4), e apenas duas das amostras anteriormente consideradas como infecções mistas se repetiram, tendo a maioria (N = 13) sido marcada como *Trypanosoma* spp. e apenas 4 amostras como infecções monoespecíficas (**Tabela 22**).

Tabela 22 - Comparação entre amostras identificadas como infecções mistas que, após PCR-RFLP foram identificadas conclusivamente como infecções monoespecíficas

Amostra	Identificação presuntiva após análise das curvas de dissociação	Identificação conclusiva após PCR-RFLP
47.2 F	<i>T. grayi</i> + <i>T. congolense</i>	<i>T. congolense</i>
74.13 M	<i>T. grayi</i> + <i>T. vivax</i>	<i>T. vivax</i>
84.4 M	<i>T. grayi</i> + <i>T. vivax</i>	<i>T. vivax</i>
90.16 M	<i>T. grayi</i> + <i>T. vivax</i>	<i>T. vivax</i>

Das quatro amostras identificadas conclusivamente como infecções mistas, duas haviam apresentado identificações presuntivas de *T. brucei* (61.8 F) e *T. grayi* (61.9 F), e as restantes duas mantiveram a identificação anterior (**Tabela 23**, na página seguinte).

Tabela 23 - Identificação conclusiva de amostras apresentando infecções mistas

Tipo de infecção mista	N	Identificação
<i>T. grayi</i> + <i>T. vivax</i>	2	28.7 F; 90.7 F
<i>T. grayi</i> + <i>T. congolense</i>	2	61.8 F; 61.9 F

Relativamente às infecções consideradas *Trypanosoma* spp. quanto ao agente infetante, todas elas, com exceção de uma, apresentavam valores de quantificação inferiores a 10 equivalentes de parasita. A exceção, quando apresentada num gráfico de caixa de bigodes, é claramente considerada um *outlier* severo (**Gráfico 14**). Este grupo de amostras apresenta um valor médio de quantificação entre 1,80 e 2,42 equivalentes de parasita, com intervalo de confiança de 95%.

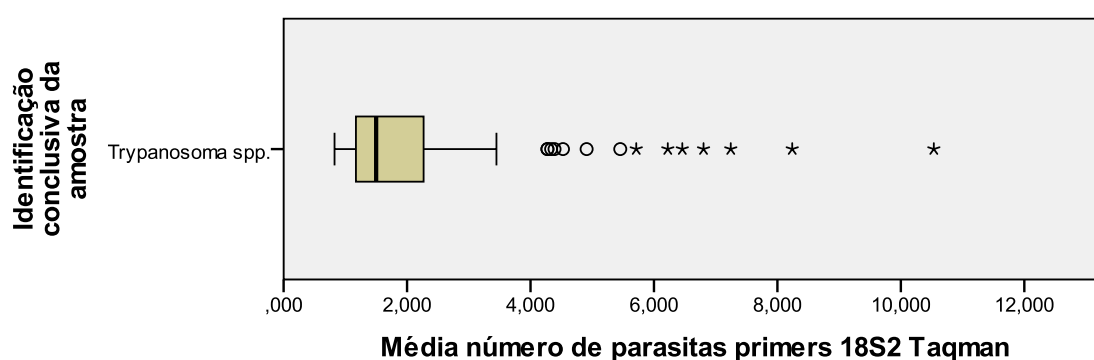


Gráfico 14 - Gráfico caixa de bigodes apresentando os valores médios de parasitas para as amostras identificadas como sendo *Trypanosoma* spp. após PCR-RFLP

3.6.2.3 – Confirmação da identificação de amostras por sequenciação

Ao longo do presente trabalho foram efetuadas 12 sequenciações a partir de produtos de PCR obtidos com utilização dos *primers* Tryp18S, para confirmação das identificações obtidas quer por PCR em tempo real, quer por PCR-RFLP. Os resultados estão expostos na tabela apresentada na página seguinte (**Tabela 24**).

Tabela 24 - Amostras enviadas para sequenciação e sua identificação

Amostras	Resultado da sequenciação
16.8 M	<i>T. grayi</i>
21.6 M	<i>T. vivax</i>
26.5 M	<i>T. brucei</i>
30.3 F	<i>T. congolense</i>
44.1 F	<i>T. congolense</i>
44.4 F	<i>T. congolense</i>
45.3 F	<i>T. congolense</i>
46.6 M	<i>T. congolense</i>
46.9 M	<i>T. grayi</i>
46.11 M	<i>T. congolense</i>
52.3 F	<i>T. vivax</i>
65.8 M	<i>T. brucei</i>

3.6.2.4 – Confirmação da infecção por *T. brucei* s.l.

Tendo em conta que um dos objetivos principais do presente trabalho foi o de estabelecer a presença ou ausência dos parasitas responsáveis pela THA em circulação nos vetores *Glossina* na RGB, tornou-se imperativo a continuação do estudo das duas amostras identificadas como estando infetadas por *T. brucei*, para as identificar corretamente ao nível subespecífico.

Nesse sentido, foram efetuadas duas reações de PCR convencional (ver **2.5.1.3** e **2.5.1.4**), a primeira utilizando os *primers* Tb177 (**Figura 13**, página seguinte), e a segunda utilizando os *primers* TgsGP.

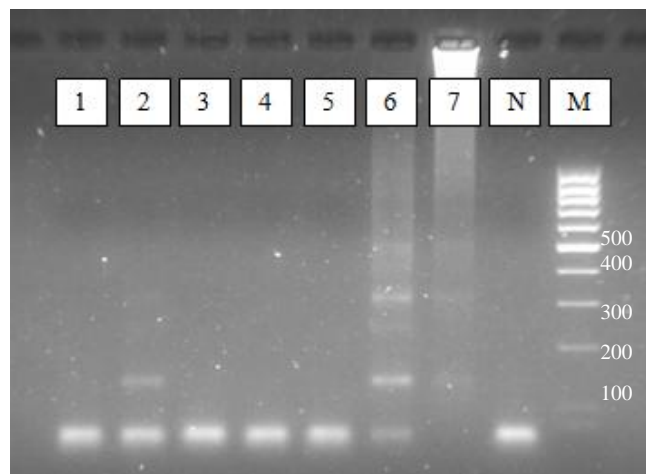


Figura 13 - Gel agarose com amostras após PCR convencional com *primers* Tb177

1 – 16.8 M; **2** – 26.5 M; **3** – 32.12 M; **4** – 46.9 M; **5** – 56.8 M; **6** – 65.8 M; **7** – Controlo positivo;

N – Controlo negativo; **M** – *ladder* de ADN

Como é visível, apenas as amostras das linhas **2** (26.5 M) e **6** (65.8 M) apresentam uma banda de aproximadamente 134 pares de bases, tal como o controlo positivo, indicando então que estas amostras são provenientes de moscas infetadas por *Trypanosoma brucei* spp. (Becker et al. 2004).

Posteriormente, para continuação do estudo, foi efetuado PCR com *primers* específicos para *Trypanosoma brucei gambiense* a estas duas amostras, cujo resultado foi negativo. Assim, por exclusão de partes, e tendo em conta que nesta região do continente africano não seria expectável encontrar a espécie de parasita *T. b. rhodesiense*, considerou-se que os parasitas infetantes destas duas amostras são pertencentes à subespécie *Trypanosoma brucei brucei*.

3.6.2.5 – Resultados da identificação, por região da RGB

No ponto **3.6.1.1** foi já apresentado o número de glossinas infetadas em cada uma das quatro regiões estudadas, sendo agora apresentados os resultados relativos às espécies de tripanossomas infetantes, identificadas após PCR em tempo real com *SYBR® Green I* seguido de PCR-RFLP com enzima de restrição TfiI.

Das moscas capturadas na região de Biombo, 84 foram consideradas infetadas. Neste grupo de amostras foram identificados 1 *T. brucei brucei*, 3 *T. congolense*, 6 *T.*

vivax, 35 *T. grayi*, 1 infecção mista (*T. grayi* + *T. vivax*) e 38 amostras *Trypanosoma* spp.

Na região de Tombali, encontraram-se 110 glossinas infetadas. Destas infecções, 25 eram provocadas por *T. congolense*, 3 por *T. vivax*, 27 por *T. grayi*, 2 infecções mistas (*T. grayi* + *T. congolense*) e 53 amostras *Trypanosoma* spp. Não foram encontradas infecções provocadas por *T. brucei*.

Na região de Bolama-Bijagós foram encontradas 34 glossinas infetadas, sendo que 1 das infecções era atribuível a *T. brucei brucei*, 5 a *T. congolense*, 3 a *T. vivax* e 5 a *T. grayi*, com 20 identificações *Trypanosoma* spp. Nesta região não se encontraram infecções mistas.

Por último, na região de Gabú, das 13 amostras positivas, 1 encontrava-se infetada com *T. congolense*, 5 com *T. vivax*, 2 com *T. grayi*, 1 com mais que uma espécie de parasita (*T. grayi* + *T. vivax*) e em 4 não se conseguiu uma identificação conclusiva. Nesta região não se encontraram infecções provocadas por *T. brucei*.

Na figura apresentada na página seguinte (**Figura 14**) está representado o mapa da República da Guiné-Bissau, mostrando a percentagem atribuível a cada uma das espécies de tripanossoma, nas diferentes regiões. Deve tomar-se em atenção, contudo, que não se encontram representados os números absolutos de amostras positivas por região, mas apenas a proporção relativa de cada uma das espécies dentro das que foram consideradas positivas em cada uma das regiões.

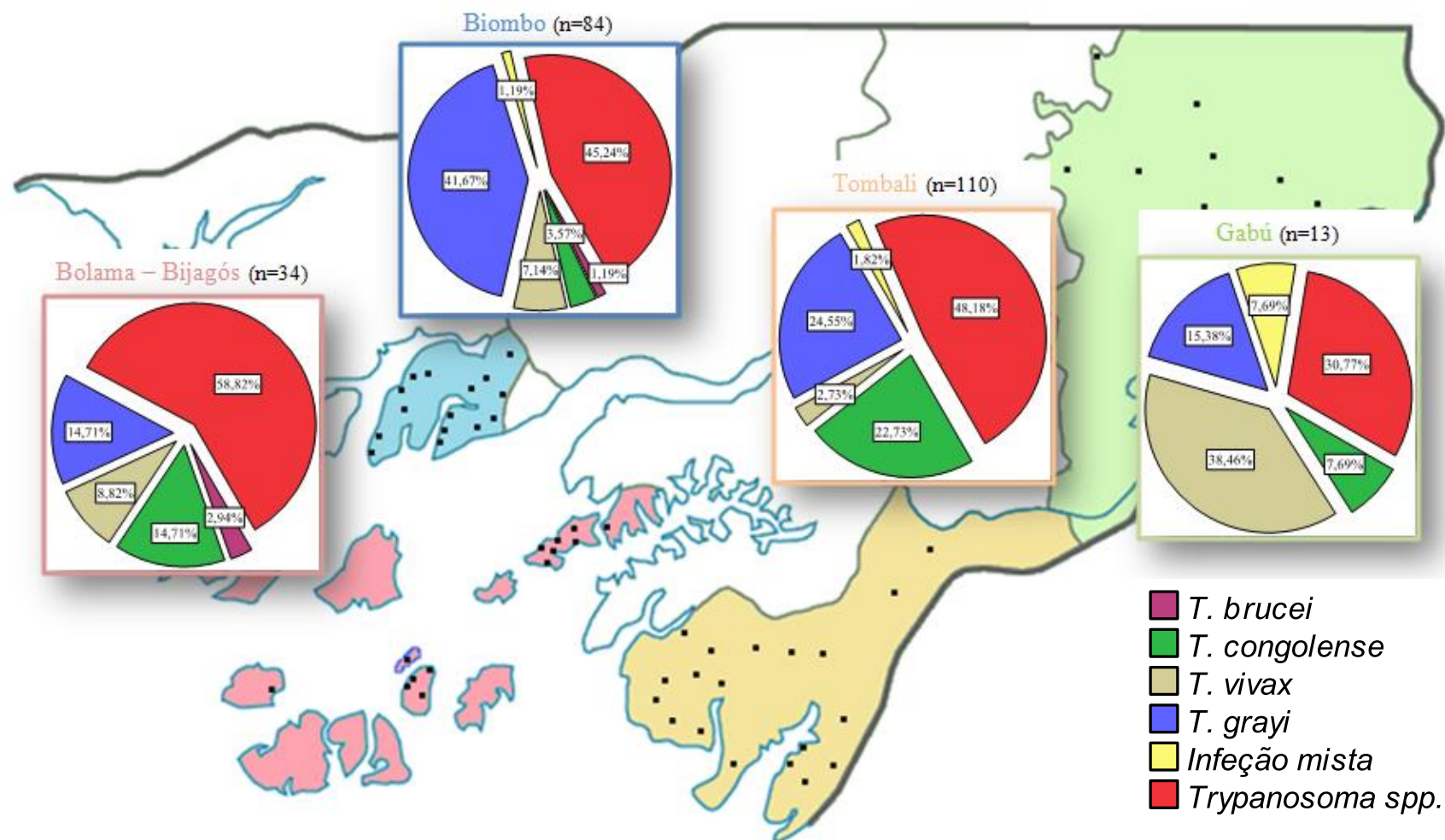


Figura 14 - Mapa da RGB, mostrando a identificação dos diversos tripanossomas identificados, por região.

Os pontos representam as localidades onde foram efetuadas as capturas das glossinas. Os valores apresentados são referentes apenas aos casos avaliados como positivos.

3.6.2.6 – Resultados da identificação, por espécie de tripanossoma

Depois de analisados todos os resultados provenientes da identificação, a amostra estudada apresenta as características expostas na tabela seguinte (**Tabela 25**).

Tabela 25 - Caracterização da amostra, quanto à infecção por *Trypanosoma* spp.

Identificação final	Número absoluto	Porcentagem
<i>T. brucei brucei</i>	2	0,26 %
<i>T. vivax</i>	17	2,24 %
<i>T. congolense</i>	34	4,46 %
<i>T. grayi</i>	69	9,06 %
Infeções mistas	4	0,52 %
<i>Trypanosoma</i> spp.	115	15,09 %
Sem infecção	521	68,37 %
Total	762	100 %

4 – Discussão e Conclusão

4.1 – Discussão

As diferentes espécies de parasitas do género *Trypanosoma* são responsáveis por doenças graves tanto em humanos (Tripanossomose Humana Africana) como em animais (Tripanossomose Animal), patologias que têm grande impacto socio-económico em diversos países africanos. Historicamente, a República da Guiné-Bissau apresentava, até à década de 60 do século XX, um comportamento endémico relativamente à THA e, muito embora atualmente se encontre referenciado como um país livre da patologia humana, tal pode dever-se à não realização de actividades de recenseamento de casos da doença. No presente trabalho procurou-se determinar a taxa de infeção por tripanossomas em glossinas capturadas durante o ano de 2004 na RGB, procedendo à identificação desses parasitas com o intuito de avaliar quanto à sua existência na população dos vetores da patologia. Para tal desenvolveram-se diversas metodologias de PCR em tempo real e PCR-RFLP que permitiram não só a determinação da carga parasitária como também a identificação correta dos parasitas infetantes.

4.1.1 – Quantificação de ADN de *Trypanosoma* por PCR em tempo real

Procurou-se, no presente trabalho, desenvolver *primers* adequados para a realização de técnicas de PCR em tempo real, que fossem ao mesmo tempo mais sensíveis que os atualmente disponíveis e que permitissem a distinção entre diversas espécies de tripanossomas potencialmente responsáveis pelas infeções. Em termos de quantificação, o PCR em tempo real é superior ao PCR convencional porque neste os produtos de amplificação formados são analisados no final da reação. Durante os últimos ciclos de amplificação há uma acumulação de fatores de inibição e uma diminuição na formação de novas cadeias, atenuando assim eventuais diferenças que possam existir entre duas amostras no que diz respeito ao número de moléculas de ADN alvo. O PCR em tempo real, por se basear na leitura da emissão de fluorescência ao longo da fase exponencial da reação de amplificação, não está exposto a estas interferências, possibilitando assim uma quantificação mais acertada. Para além disto, é uma técnica de rápida execução e que não requer manipulação de produtos pós-PCR,

evitando assim potenciais contaminações com produtos amplificados (Bell & Ranford-Cartwright 2002).

Foram assim desenvolvidos os *primers* Tryp18S e Tryp18S2, sendo que os primeiros foram testados numa metodologia *SYBR® Green I* e os segundos com metodologia *Taqman®*. Tal como o nome indica, estes *primers* amplificam uma região do genoma do parasita que codifica para o ARN da subunidade pequena (18S) do ribossoma (ver **Figura 5**). Esta região foi a escolhida por este *i*) ser um gene com regiões altamente conservadas, permitindo assim a ligação dos *primers* nas diferentes espécies, *ii*) apresentar variações na cadeia de nucleótidos que são específicas para diferentes espécies de *Trypanosoma*, e *iii*) estar presente num *locus* multi-cópia (entre 100 a 200 cópias por tripanossoma (Adams et al. 2008)).

Para o desenvolvimento dos diferentes *primers* recorreu-se ao alinhamento de 8 sequências de ADN que codificam para a subunidade 18S do ARN ribossomal de *Trypanosoma*, selecionados da base de dados do NCBI (ver **2.5.3.1**). As principais dificuldades sentidas nesta fase estiveram relacionadas com a procura de uma sequência nucleotídica para a qual fosse possível desenhar *primers* que fosse, ao mesmo tempo, conservada o suficiente para ser específica de *Trypanosoma s.l.* e variável o suficiente para se conseguir distinguir entre as diversas espécies com a mesma reação de PCR em tempo real. Acabaram por ser selecionadas duas regiões, praticamente contíguas, uma como alvo para utilização da metodologia *SYBR® Green I* e outra para utilização da metodologia *Taqman®*, nomeadamente, nesta última, no que respeita à escolha de um local para o qual fosse viável desenvolver uma sonda de hibridação.

Procurando testar a competência destes *primers* para determinação da carga parasitária nas amostras foi efetuado um estudo preliminar comparativo entre as duas metodologias. Para a quantificação de parasitas propriamente dita foram efetuadas diluições de uma solução-mãe, já existente no laboratório do IHMT, contendo ADN de *T. b. brucei*. Escolheu-se esta solução para efetuar a calibração, e não uma calibração específica para cada uma das diferentes espécies porque, por um lado, não havia modo de saber *a priori* quais as espécies que poderiam eventualmente ser identificadas, e por outro, porque existem na literatura dados que permitem fazer a extrapolação dos valores obtidos entre os membros do grupo *Trypanozoon* e os restantes. Segundo Njiru et al.

(2005), os *primers* desenvolvidos para amplificar a região ITS1 têm uma sensibilidade semelhante entre os diferentes géneros de tripanossomas do grupo Salivaria, pese embora o facto de não ter sido estudado o parasita *Trypanosoma suis*, único representante do género pycnomonas. Esta informação permite assim inferir que o número de cópias desta fração de gene será semelhante ao longo dos diferentes géneros. Nesse sentido, e uma vez que a região ITS1 não existe de forma independente no genoma, mas faz parte de um gene que apresenta uma estrutura determinada (ver **Figura 5**) em que se encontra flanqueado, num dos lados, pela região para a qual foram desenvolvidos *primers* no presente trabalho, considerou-se que o gene 18S existia também em igual número nos diferentes géneros, ou pelo menos que não apresentaria diferenças significativas. Por este motivo considerou-se que efetuar a curva de calibração da quantificação apenas a partir da solução de *T. b. brucei* seria uma aproximação válida ao número de cópias do gene 18S existentes nos diferentes tripanossomas que se poderiam identificar. Apesar disto, ao longo do trabalho foi identificada a espécie *Trypanosoma grayi*, para a qual não existem na literatura dados relativos nem ao número de cópias que possa apresentar desta região genómica, nem tão pouco quanto à sensibilidade de *primers* para aquela região, sendo que assim não se pode garantir que os resultados da quantificação estejam absolutamente corretos relativamente a esta espécie. Não é, contudo, expectável que a diferença seja muito grande, uma vez que está descrito na literatura que o número de cópias varia entre 100 e 200 (Adams et al. 2008). Procurou-se efetuar um estudo com realização de uma curva de calibração utilizando ADN deste parasita, mas não foi possível por não existirem isolamentos deste tripanossoma no criobanco de estirpes mantido pelo Instituto de Medicina Tropical, em Antuérpia (Bélgica).

No estudo preliminar comparativo entre as duas metodologias, o sistema *Taqman*®, que utilizava os *primers* Tryp18S2F, Tryp18S2R e sonda Tryp18S2P demonstrou ser o mais adequado ($R^2 = 0,991$; Eff.= 90,099%), muito embora a metodologia *SYBR*® *Green I* com *primers* Tryp18SF e Tryp18SR tivesse obtido valores de correlação (R^2) e de eficiência da reação, em média, bastante aproximados àquela ($R^2 = 0,978$; Eff.= 89,488%). A decisão pela não utilização destes segundos *primers*, com metodologia *SYBR*® *Green I*, prendeu-se sobretudo com a sua incapacidade

intrínseca, em termos de quantificação, de discriminar entre produtos amplificados inespecificamente e produtos amplificados especificamente durante a reação (Bell & Ranford-Cartwright 2002). Tal comportamento prende-se com o facto da metodologia depender da atividade de um corante fluorescente que atua quando se intercala em ADN em cadeia dupla, pelo que produtos inespecíficos como dímeros de *primers*, por exemplo, acabam por apresentar sinal de fluorescência, tal como foi demonstrado (ver **Gráfico 3**). Neste gráfico é possível ver o sinal obtido com o controlo negativo utilizando esta metodologia, sendo que nesta amostra a única fonte de ADN são os *primers*. O principal problema com a utilização destes *primers* foi então a possibilidade do sinal inespecífico atribuível a dímeros de *primers* poder vir a deturpar os valores de quantificação dos parasitas, com particular influência nas amostras com cargas parasitárias baixas, pelo que se decidiu pela sua não utilização para quantificação.

Por comparação, com a metodologia *Taqman*® não existe sinal de fluorescência no controlo negativo. Tal facto advém da utilização de uma sonda específica que se liga ao ADN em cadeia simples, apenas quando a sequência nucleotídica é complementar. Durante a reação de PCR é que, devido à atividade 5' exonuclease da ADN polimerase, a sonda é hidrolisada e o sinal de fluorescência emitido, permitindo um aumento da especificidade associada à metodologia, uma vez que mesmo que se formem dímeros de *primers* a sonda não hibridará com estes produtos. Foi por estes motivos escolhida a metodologia *Taqman*® para quantificação da carga parasitária das glossinas, sendo assim determinados os restantes parâmetros necessários à validação do método.

Na determinação da sensibilidade dos *primers* Tryp18S2, estes mostraram ser bastante sensíveis, permitindo a quantificação absoluta de um espetro alargado de número de parasitas (10^5 até 1 equivalente de parasita – e.p.). Esta é, de resto, a principal vantagem da utilização de uma metodologia PCR em tempo real sobre o PCR convencional: possibilitar quantificações do material genético precisas, exatas e reproduzíveis.

A sensibilidade obtida (1 e.p. = 0,1 pg ADN) é equivalente ao que se encontra descrito na literatura para os *primers* específicos de cada uma das espécies de parasitas encontrados em metodologias de PCR convencional, e é superior à sensibilidade

reportada para os *primers* ITS1, que, tal como os desenvolvidos ao longo deste trabalho, são *primers* genéricos (revisto em Njiru (2005), excepto para *T. brucei s.l.*).

Relativamente à espécie *T. brucei s.l.*, existe na literatura uma descrição de utilização dos *primers* Tb177, para diagnóstico e acompanhamento do tratamento, em humanos, de infeção por *T. brucei rhodesiense* (Vingerhoets et al. 2011). Esta análise só é possível tendo em conta informações de epidemiologia e distribuição geográfica da patologia, uma vez que os *primers* apresentados são uma variação, melhor adaptada à metodologia de PCR em tempo real utilizando *SYBR® Green I*, dos *primers* TBR descritos por Moser (1989), que apresentam sensibilidade apenas a parasitas pertencentes ao sub-género *Trypanozoon*. Apesar deste facto, Becker et al. (2004) reportam uma sensibilidade 10 vezes superior (concentração de ADN correspondente a 0,1 parasitas), à obtida com os *primers* em estudo, o que está de acordo também com os valores obtidos por Moser (1989). Tal diferença na sensibilidade pode dever-se ao facto dos *primers* TBR e Tb177 estarem direccionados para amplificação de uma região dos minicírculos de ADN do tripanossoma com cerca de 10000 cópias (Eisler et al. 2004), enquanto que a região 18S está presente, em média, com 100 a 200 cópias (Adams et al. 2008).

O facto da metodologia estudada ser mais sensível que o reportado na literatura para diferentes *primers* direccionados para as diversas espécies pode dever-se ao facto da metodologia de PCR em tempo real ser intrinsecamente mais sensível que as metodologias de PCR convencional, porque a visualização de ADN com a metodologia convencional, em gel de agarose e corado com brometo de etídio, apenas permite a visualização de bandas quando a quantidade de ADN presente for superior a 20 ng (Alberts et al. 2002).

Relativamente à especificidade, o estudo efetuado (ver **3.4.1.2**) revelou que, muito embora os *primers* Tryp18S2 não amplifiquem uma grande variedade de parasitas de outras espécies, apresentam amplificação para o género *Leishmania*. Por esse motivo, foram tomadas medidas para garantir que os parasitas identificados na amostra ao longo do trabalho não eram pertencentes a este género, as quais passaram pela realização de PCR convencional direccionado para a identificação de *Leishmania s.l.* a todas as amostras que apresentassem uma identificação à partida coerente com esse

gênero. Após análise da sequência do gene 18S de *Leishmania*, e de se confirmar que efetivamente existia ligação dos *primers* e inclusivamente um local de corte com a enzima de restrição utilizada, chegou-se à conclusão que as bandas que eventualmente pudessem surgir após PCR-RFLP apresentavam um padrão de restrição indistinguível, por análise dos géis de agarose, do padrão esperado para *T. vivax*. Assim, todas as espécies identificadas como *T. vivax* foram estudadas com os *primers* específicos para *Leishmania*, não existindo nenhuma amostra positiva. Esta reação cruzada pode dever-se ao facto dos parasitas do género *Leishmania* serem tripanossomatídeos, e nesse sentido apresentarem pouca diferenciação (medida em diferenças na sequência nucleotídica) relativamente a outros membros desta família. Tornou-se importante determinar se as amostras de glossinas se encontravam infetadas com parasitas deste género devido a dois grandes motivos: por um lado, a existência destes parasitas no território da RGB (WHO Expert Committee on the Control of Leishmaniases 2010); por outro, a existência na literatura de uma descrição de transmissão mecânica (em meio laboratorial) de *Leishmania* por glossinas (Lightner & Roberts 1984).

Neste sentido, sugere-se a utilização destes *primers* para quantificação em situações nas quais se consiga garantir a inexistência de infeção cruzada com estes tripanossomatídeos.

Relativamente à variabilidade intra-ensaio e inter-ensaio, os valores obtidos, para diferentes quantidades de parasitas, foram bastante satisfatórios, com variações inferiores a 10% para todas as diluições utilizadas, garantindo assim uma quantificação precisa dos parasitas em estudo.

Sugere-se também a continuação do estudo da utilidade dos *primers* Tryp18S2, com metodologia *Taqman*®, para determinação de cargas parasitárias, nomeadamente a realização de estudos comparativos com outras metodologias e com outros *primers*, e eventual aplicabilidade para quantificação de parasitas em amostras de pacientes humanos e animais. Em teoria, esta metodologia pode ser utilizada para estudar a evolução da patologia em resposta a antibioterapia com grande precisão, mas obviamente esta afirmação fica dependente do prosseguimento dos estudos.

4.1.2 – Identificação das espécies de *Trypanosoma*

Para a identificação das espécies de *Trypanosoma* presentes nas amostras, foram desenvolvidas duas metodologias: a primeira utilizou os *primers* Tryp18S com metodologia *SYBR® Green I*, que permitiu a distinção das espécies através das análises das curvas de dissociação; a segunda utilizou também os *primers* Tryp18S mas com metodologia de PCR convencional, em que o produto, depois da reação de amplificação, foi sujeito à atividade de uma enzima de restrição (Tfil), produzindo diferentes padrões de restrição, visualizados depois por eletroforese em gel de agarose, que permitiram a diferenciação das várias espécies.

Relativamente à análise das curvas de dissociação, os estudos efetuados para determinação das temperaturas específicas para cada um dos tripanossomas encontrados, permitiram obter teoricamente uma boa separação entre os diversos picos, sendo que a diferença menor (1,39 °C) se encontrava entre o pico referente a *T. grayi* e o pico referente a *T. brucei*. Estas diferenças nas temperaturas mostraram ser, para a maior parte das amostras, suficientes para discriminar entre as diferentes espécies, tendo sido inclusivamente enviadas amostras para sequenciação que confirmaram os resultados obtidos. Apesar disto, existiram algumas identificações obtidas através desta metodologia que não foram corroboradas pelos resultados obtidos por PCR-RFLP, efetuado de seguida. Uma das maiores alterações ocorreu com a amostra 56.8 M, que apresentou um pico referente a *T. grayi* e um padrão de restrição correspondente a *T. vivax*, sendo que a temperatura de dissociação estabelecida para *T. vivax* foi de aproximadamente 84,25 °C.

Outro ponto que foi necessário estabelecer foi a temperatura de dissociação relativa a produtos inespecíficos da reação de PCR em tempo real, como por exemplo dímeros de *primers*. Esta necessidade surgiu do facto do corante intercalante de ADN utilizado, o *SYBR® Green I*, ser inespecífico em relação ao ADN que intercala, sendo a única condição necessária o mesmo encontrar-se em cadeia dupla. Por este motivo, qualquer produto inespecífico da reação pode apresentar um sinal de fluorescência, e um modo de avaliar quanto à sua presença é, tal como com as espécies, o estabelecimento da sua temperatura de dissociação. Esta acabou por ser diferente o suficiente das específicas para os tripanossomas, permitindo assim a sua distinção.

Foi também estudada a possibilidade de reatividade cruzada dos *primers* com ADN proveniente de moscas do género *Glossina*, porque, muito embora a análise especificidade da sequência dos *primers* Tryp18S, efetuada com recurso ao programa BLAST®, não tivesse demonstrado homologia importante, acabou por se verificar, com estudo efetuado recorrendo à reação de PCR em tempo real propriamente dita, que existia amplificação atribuível ao ADN do vetor. Tal como no ponto anterior, foi também observada uma temperatura de dissociação específica do ADN proveniente da *Glossina*, que mostrou ser diferente o suficiente dos restantes a ponto de ser facilmente identificável como tal. Este foi mais um dos motivos que impossibilitaram a utilização desta metodologia para quantificação.

Todos estes fatores são, por um lado, demonstrativos das dificuldades da utilização e interpretação de resultados obtidos em ensaios que utilizem este tipo de metodologia, e por outro, indicativos da necessidade de continuação da otimização da técnica utilizada para tentar minimizar o impacto destes fatores. Este é, de resto, um ponto descrito na literatura especializada como sendo uma das principais dificuldades da sua utilização (Bell & Ranford-Cartwright 2002; Rolão 2004).

Relativamente ao PCR-RFLP, foi possível, através da análise das sequências nucleotídicas dos diferentes tripanossomas estudados, escolher uma enzima de restrição que, depois de atuar, permitiu a diferenciação das diversas espécies através da análise dos diferentes padrões de restrição. Apesar disto, esta metodologia demonstrou ser menos sensível que a técnica desenvolvida de PCR em tempo real com metodologia *SYBR® Green I*, apresentando um limite de sensibilidade de 10 equivalentes de parasita por reação, o que representa uma diferença de uma ordem de grandeza. Este facto pode dever-se à já referida diminuição da sensibilidade com utilização de géis de agarose, e pode explicar o aumento do número de amostras consideradas como *Trypanosoma* spp. de uma técnica para a seguinte, ou mesmo a diminuição no número de amostras consideradas como apresentando infeções mistas, por ocultamento da espécie eventualmente menos representada na amostra (Geysen et al. 2003).

A diferença encontrada entre o número de bandas esperadas no perfil de restrição de *T. grayi* (3 bandas – 23 p.b.; 56 p.b.; 85 p.b.) e as efetivamente observadas (5 bandas) é justificada pela existência de dois locais de corte para a enzima, e pela

maior ou menor eficiência da atividade da enzima em cada um desses locais. Lendo a sequência relativa a *T. grayi* no sentido 5' – 3', se a enzima atuar apenas no primeiro local de corte são formadas duas cadeias, uma com 23 p.b. e outra com 141 p.b.. Se, por outro lado, a enzima atuar apenas no segundo local de corte, então formam-se duas cadeias, uma com 56 p.b. e a outra com 108 p.b.. Assim, numa mesma reação, existem cadeias que sofrem cortes no dois locais de restrição, cadeias que são apenas cortadas uma vez, num ou noutro local, e cadeias que não sofrem atividade enzimática. Não considerando a banda correspondente ao produto não digerido (que, de resto, está também presente nas amostras correspondentes às outras espécies e que auxilia, em algumas situações, na interpretação dos resultados), são formadas as cinco bandas que acabam por aparecer no padrão de restrição da espécie (23 p.b., 56 p.b., 85 p.b., 108 p.b. e 141 p.b.). Existe, contudo, uma dificuldade acrescida na interpretação dos resultados se a quantidade de produto formado numa destas reações acessórias não atingir o limiar de sensibilidade já definido com a utilização de géis de agarose, o que acaba por disfarçar a presença de bandas.

A aplicabilidade da metodologia de PCR-RFLP no terreno depende da existência de material especializado pelo menos para a realização de PCR convencional e refrigeração necessária à conservação da enzima de restrição. Contudo, pode ser adaptada para utilização em centros de referência, com utilidade em estudos epidemiológicos com grandes quantidades de amostras, para uma diferenciação rápida das espécies de tripanossomas presentes (Geysen et al. 2003).

Esta foi a primeira descrição da utilização de *primers* genéricos com capacidade de identificar *Trypanosoma grayi* (Adams et al. 2010).

4.1.3 – Aplicação das técnicas à amostra em estudo

As amostras utilizadas neste trabalho foram selecionadas a partir de um conjunto de moscas do género *Glossina* que haviam sido capturadas no âmbito de uma tese de mestrado (Badjana 2004). Nesse trabalho, Badjana capturou e identificou 1238 glossinas, de ambos os sexos, nas 8 regiões da RGB (num total de 91 localidades), sendo que dessas moscas, 99,11% foram identificadas como pertencendo à espécie *Glossina palpalis gambiensis*. No presente trabalho não foram utilizadas todas as

moscas que haviam sido capturadas, mas apenas as provenientes das regiões de Biombo, Tombali, Bolama-Bijagós e Gabú, pelos motivos já explicados em **2.1.2**. Esta situação deve ser tomada em consideração na avaliação dos resultados obtidos porque, muito embora tenha sido avaliada mais de metade da amostra original (762 moscas – 61,5%), ficaram ainda 476 glossinas por estudar, capturadas nas restantes 4 regiões. Uma vez que a distribuição de casos da patologia tende a ser focal (Fèvre et al. 2008), a presença de parasitas de determinadas espécies pode ter sido subavaliada. Apesar de tudo, as regiões das quais se estudaram os vetores foram regiões onde efetivamente existem registos históricos de transmissão da patologia humana (Cecchi et al. 2009; Cattand et al. 2001), pelo que a possibilidade da existência de transmissão vetorial não deveria ser posta de parte à partida, ou seja, a probabilidade de encontrar parasitas de determinada espécie nos vetores em princípio não sofreria com o facto de não terem sido utilizadas moscas de todas as regiões prospectadas.

Relativamente ao número e percentagem de glossinas infetadas no território da RGB, não se encontram descritas na literatura recente dados que permitam uma comparação objetiva dos resultados obtidos no presente trabalho. A última referência que se encontrou a este respeito remonta a 1950, na época da Missão de Estudo e Combate da doença do sono na Guiné Portuguesa (Almeida 1950). Nesse documento é reportada uma captura de 6509 moscas, estando 290 infetadas (4,4 %). Metade das amostras positivas estava infetada com tripanossomas pertencentes a um grupo que incluía *T. brucei*, *T. gambiense*, e *T. rhodesiense* (50 % das positivas – 2,2 % da amostra total). De resto, 109 moscas (35 % das positivas – 1,6 % da amostra total) estavam infetadas com *T. vivax* e *T. congolense*, e 9 moscas (3 % das positivas – 0,1 % da amostra total) com *T. grayi*. Por último, 34 moscas (12 % das positivas – 0,5 % da amostra total) encontravam-se infestadas por tripanossomas indeterminados (Almeida 1950). Comparando então estes resultados com os obtidos no trabalho atual, podemos ver que a percentagem de glossinas infetadas aumentou, dos 4,4 % para os 31,6 % (ver **3.6.1.1**). Isto pode representar um aumento efetivo da taxa de infeção das glossinas, mas provavelmente estará mais relacionado com um aumento da sensibilidade das técnicas utilizadas para pesquisa de tripanossomas.

Aquando da realização do artigo original, ainda não se havia definido que *T. brucei brucei*, *T. brucei gambiense* e *T. brucei rhodesiense* eram três subespécies de *T.*

brucei s.l., pelo que os resultados apresentados são referentes ao eventual conjunto das três espécies. Assim, os resultados não são absolutamente comparáveis com os obtidos no presente trabalho, porque foram identificados apenas parasitas da espécie *T. brucei brucei*. Assim, a diminuição da percentagem observada, de 2,2 % para 0,26 % pode mascarar uma manutenção dos níveis de infeção por *T. brucei brucei*, se tiver sido totalmente devida ao eventual desaparecimento de *T. brucei gambiense* em circulação. Isto é corroborado pela existência de transmissão em humanos deste parasita aquando da realização das missões de Estudo e Combate da doença do sono na Guiné Portuguesa (Ferreira 1947), e a suposta ausência atual da patologia (Simarro et al. 2011). Relativamente a *T. vivax* e *T. congolense*, estas duas espécies de parasita eram indistinguíveis nas glossinas segundo os critérios de identificação de então (Lloyd & Johnson 1924). Apesar disto, é possível ver que a soma das percentagens obtidas atualmente para as duas espécies (4,46 % + 2,24 % = 6,70 %) é maior que a percentagem apresentada no artigo de 1950. As duas maiores diferenças observaram-se no grupo relativo a *T. grayi* (de 0,1 % para 9,06 %) e às amostras com identificação *Trypanosoma* spp. (de 0,5 % para 15,09 %).

A alteração da expressividade dos parasitas das diversas espécies nos vetores, e nomeadamente a diminuição de *T. brucei gambiense* e o aumento de *T. grayi*, podem estar associados a alterações do ecossistema (migração de populações, por exemplo), eventualmente desencadeadas pelas situações de conflito que se conhecem no território, que levam a modificações dos hábitos alimentares das glossinas. Esta análise peca, contudo, pela falta de dados entre as décadas de 1950-60 e a atualidade, devido ao reduzido (senão mesmo inexistente) número de estudos realizados.

O aumento do número de amostras positivas com identificação *Trypanosoma* spp., ou seja, em que não foi possível identificar a espécie, pode estar diretamente relacionado com o aumento da sensibilidade da técnica de quantificação, que não foi acompanhada pela sensibilidade das técnicas de identificação utilizadas no presente trabalho. Apesar disto, é possível que existam na amostra estudada espécies que realmente não se enquadrem nos critérios de identificação estabelecidos. Estes factos revelam que existe espaço para o melhoramento e otimização das metodologias em causa, no sentido de se obter uma caracterização mais completa das amostras estudadas.

A análise do mapa representado na **Figura 14** permite concluir que, apesar das amostras capturadas nas diferentes regiões da RGB terem representatividades diferentes, em todas elas foram identificados tripanossomas de todas as espécies (com a exceção de *T. brucei*), representando homogeneidade na sua distribuição. Assim, será à partida expectável, estando todas as restantes condições necessárias cumpridas, que a patologia animal provocada por estes parasitas se encontre disseminada por todo o território da RGB (ou pelo menos, claro está, pelas regiões estudadas).

Analisando os resultados relativamente ao número de glossinas infetadas, por sexo do vetor, observa-se que a proporção de glossinas infetadas do sexo feminino é superior à proporção de glossinas infetadas do sexo masculino. Este facto está de acordo com o que se encontra descrito na literatura, e é justificado pelo facto de as fêmeas viverem mais tempo que os machos, aumentando assim a probabilidade de se alimentarem num hospedeiro infetado e adquirirem a infeção (Leak 1999). Este facto é corroborado pela observação de que, depois de infetadas, não existem, como foi demonstrado no presente trabalho, diferenças entre as cargas parasitárias médias apresentadas por machos e fêmeas do vetor, o que é indicativo de igual susceptibilidade ao desenvolvimento e multiplicação dos parasitas. Se a susceptibilidade é a mesma, as diferenças observadas devem-se em princípio a outros fatores, como seja a esperança média de vida de machos e fêmeas, ou o número de picadas por cada uma das partes nesse período.

Se no entanto se observar o número de glossinas infetadas, de ambos os sexos, consoante a espécie de tripanossoma infetante, é notório que existe uma diferença na proporção de fêmeas e machos infetados com *T. congolense*, que não está presente nas moscas infetadas quer por *T. vivax*, quer por *T. grayi*. Nas moscas infetadas com *T. congolense*, a percentagem de fêmeas infetadas é superior à dos machos, de acordo com o que foi explicado anteriormente. Este comportamento, contudo, não é observado nas moscas infetadas com *T. vivax* nem com *T. grayi*, em que a percentagem de moscas infetadas de cada um dos sexos é praticamente igual (50 % machos, 50 % fêmeas). Esta distribuição de casos está também descrita na literatura (para *T. vivax*), e está associada com o local anatómico do organismo da glossina onde se dá o desenvolvimento do parasita. O *T. congolense*, que se desenvolve no intestino médio do vetor, está mais exposto a fatores anti-tripanosoma presentes nesse local que o *T. vivax*, que se

desenvolve exclusivamente no probóscis das moscas (Leak 1999). O presente trabalho apresenta a hipótese de que algo semelhante possa decorrer para *T. grayi*, que se desenvolve no intestino posterior do vetor, demonstrando assim a importância do intestino médio do vetor na imunidade do mesmo. A diferença observada para *T. congolense* pode, então, dever-se à proporção de infecções que não se chega a desenvolver nos machos, e que só se desenvolve nas fêmeas porque estas vivem mais tempo e fazem mais alimentações potencialmente infetantes.

Muito embora a captura das moscas não tenha sido realizada no âmbito deste trabalho, tendo sido efetuada exclusivamente no âmbito de uma outra tese de mestrado (Badjana 2004), não deixa de ser algo interessante de avaliar o facto da grande maioria das moscas capturadas pertencer a uma mesma subespécie, sendo que as restantes espécies encontradas (*Glossina morsitans submorsitans* e *Glossina longipalpis*) representavam 0,89% da amostra total (Badjana 2004). Um dos motivos apresentados pelo autor para estes dados prende-se com o facto das moscas terem sido capturadas durante a estação seca, altura do ano em que existe uma diminuição do número das espécies menos representadas, influenciando negativamente a sua representatividade. Uma comparação das percentagens das espécies e subespécies de *Glossina* nos anos de 1932, 1944 e 1946 havia já sido efetuada (Ferreira, 1946), com a particularidade de estarem organizadas segundo a estação da sua captura. Os dados foram então os seguintes:

- 1932, estação das chuvas: *G. palpalis gambiensis* 42,96%; *G. longipalpis* 51,01%; *G. morsitans submorsitans* 5,66%; *G. fusca* 0,37%;
- 1944, estação seca: *G. palpalis gambiensis* 94,63%; *G. longipalpis* 1,63%; *G. morsitans submorsitans* 3,74%; *G. fusca* 0%;
- 1946, estação seca: *G. palpalis gambiensis* 81,82%; *G. longipalpis* 16,91%; *G. morsitans submorsitans* 1,02%; *G. fusca* 0%;
- 1946, estação das chuvas: *G. palpalis gambiensis* 77,63%; *G. longipalpis* 20,44%; *G. morsitans submorsitans* 1,93%; *G. fusca* 0%.

Estes dados indicam uma grande variação na representatividade das espécies de vetor presentes na RGB, mesmo durante um período de um ano, consoante a estação do ano em que foram capturadas as glossinas. Não deixa de ser surpreendente, ainda assim,

que em 1991, num trabalho efetuado na floresta Jopa-Cobiana, no nordeste da RGB, tenham sido capturadas 3.172 glossinas, das quais 96% pertenciam à espécie *G. longipalpis*, 3% a *G. morsitans submorsitans* e apenas 1% a *G. palpalis gambiensis* (Jaenson et al. 1991).

Como já foi referido (**Tabela 3**), não se conhece transmissão dos tripanossomas responsáveis pela patologia humana nas espécies *G. longipalpis* e *G. morsitans submorsitans*. Esta variação populacional dos vetores pode então ser responsável por variações na população dos tripanossomas infetantes, o que pode ser um fator importante quando se procura explicar a suposta diminuição nos casos da patologia humana. Mesmo que à data de captura das glossinas utilizadas neste trabalho existisse uma predominância da espécie *G. palpalis gambiensis*, vetor capaz de transmitir os tripanossomas responsáveis pela THA, é possível que a população desses tripanossomas tivesse já ficado reduzida devido às variações dos números dos vetores.

Como já foi referido, só é possível existir patologia quando três pressupostos se verificam: a presença do parasita, a presença do vetor (e seus reservatórios) e a presença do hospedeiro humano (Fèvre et al. 2008). Na teoria aqui explicitada, teria que ser estudada também a influência dos reservatórios animais na manutenção de uma população suficiente de parasitas em ocasiões de hipotética diminuição de vetores viáveis. Também deve ser considerada a hipótese do trabalho efetuado por Jaenson e colegas (1991) ter sido feito numa região da RGB que não fosse representativa da população glossínica em todo o país.

Tendo todos estes pontos em consideração, esta teoria pode ser uma explicação possível para a diminuição dos casos de THA na RGB, e é corroborada pelos dados já apresentados e pelo facto de no presente trabalho não se ter identificado nenhum parasita da espécie *T. b. gambiense*, merecendo por isso o desenvolvimento de estudos futuros para a testar.

Os resultados obtidos neste trabalho devem ser avaliados com alguma prudência, tendo em conta as suas limitações e o facto de apenas ter sido avaliada a população de parasitas presente nos vetores da espécie *Glossina palpalis gambiensis*. As percentagens apresentadas não são assim comparáveis, ou não permitem qualquer inferência, relativamente à prevalência quer da patologia humana quer das animais. A ausência de

algumas espécies e o aumento de representatividade de outras, quando comparados com dados do passado, podem dar algumas indicações quanto ao que será expectável encontrar, mas tanto a transmissão por picada de tripanossomas infetantes a animais e humanos, como a infeção propriamente dita estão dependentes de outros fatores que não foram abordados no presente trabalho.

Importa também referir que as glossinas utilizadas neste trabalho se encontravam conservadas, desde a data da sua captura (em 2004), em etanol 80% vol., e armazenadas à temperatura ambiente. A própria conservação em etanol pode ter provocado uma lavagem de tripanossomas de algumas estruturas das moscas, alterando assim os resultados da quantificação. Um armazenamento mais cuidadoso, ou mesmo um estudo mais próximo da data de captura, poderiam porventura ter proporcionado resultados mais fidedignos.

4.2 – Conclusão

A metodologia desenvolvida neste trabalho para quantificação de tripanossomas em glossinas permitiu uma determinação precisa e reprodutível do número de parasitas presentes nas amostras, ao longo de um espectro alargado de número de parasitas (10^5 até 1 equivalente de parasita – e.p.). As determinações efetuadas para avaliar os parâmetros necessários à validação do método (sensibilidade, especificidade, variabilidades intra e inter-ensaio) obtiveram resultados satisfatórios, mesmo considerando que as condições de armazenamento das amostras de glossinas utilizadas não seriam as mais indicadas para uma preservação adequada. Este fator deve, de resto, ser tomado em consideração na avaliação das quantificações e identificações obtidas.

Entre as duas metodologias estudadas para identificação das espécies de tripanossomas das amostras, aquela que mostrou ter um maior poder discriminatório foi a de PCR-RFLP. O sistema *SYBR® Green I*, apesar de teoricamente apresentar valores de temperatura de dissociação que permitiriam distinguir entre as espécies, demonstrou ser uma metodologia de difícil interpretação, nomeadamente por algumas amostras apresentarem valores de temperatura de dissociação que eram intermédios entre dois valores teóricos, acabando por se decidir a identificação final dessas amostras depois do estudo por PCR-RFLP. Esta metodologia, apesar de permitir uma melhor discriminação

entre as espécies, e como tal ter acabado por ser utilizada como técnica confirmatória, demonstrou ser menos sensível que a anterior, aumentando assim o número de identificações conclusivas apenas ao nível do género *Trypanosoma* spp. Pode assim afirmar-se que a metodologia *SYBR® Green I* apresentou uma maior sensibilidade analítica, e a de PCR-RFLP uma maior especificidade.

No que respeita às infeções de glossinas provenientes da República da Guiné-Bissau, o estudo efetuado não encontrou indícios de presença de tripanossomas responsáveis pela patologia humana, o que pode ser indicativo do sucesso das campanhas de tratamento de casos efetuadas durante as missões de Estudo e Combate da doença do sono na Guiné Portuguesa, criadas em 1945. Devido ao reduzido número de amostras estudadas e à não inclusão de amostras de todas as regiões do país, os resultados obtidos neste estudo não excluem a existência de focos de doença humana, ficando este assunto dependente da realização de estudos futuros.

As identificações obtidas demonstraram a existência, nos vetores, de tripanossomas causadores de doenças animais. Uma vez que a infeção dos hospedeiros animais é importante no ciclo de vida dos parasitas, é de esperar que existam casos de doença animal no território. Ainda assim, o presente trabalho não permite concluir quanto à sua prevalência, por não garantir a infetividade dos vetores. A completa resolução deste assunto fica também pendente da realização de estudos de recenseamento de casos.

O presente estudo pretendeu ser uma avaliação preliminar da capacidade das técnicas desenvolvidas para aplicabilidade na quantificação e identificação de tripanossomas, devendo por isso ser avaliado em estudos futuros o seu valor potencial enquanto ferramenta de diagnóstico das diversas patologias, humanas e animais.

Referências bibliográficas

- Adams, E.R., Hamilton, P.B. & Gibson, W.C., 2010. African trypanosomes: celebrating diversity. *Trends in parasitology*, 26(7), pp.324-8. Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20382076> [Acedido Agosto 31, 2011].
- Adams, E.R. et al., 2008. The identification, diversity and prevalence of trypanosomes in field caught tsetse in Tanzania using ITS-1 primers and fluorescent fragment length barcoding. *Infection, Genetics and Evolution*, 8(4), pp.439-44. Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17826361> [Acedido Setembro 21, 2011].
- Adams, E.R. et al., 2006. Trypanosome identification in wild tsetse populations in Tanzania using generic primers to amplify the ribosomal RNA ITS-1 region. *Acta tropica*, 100(1-2), pp.103-9. Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17109808> [Acedido Novembro 20, 2011].
- Adl, S.M. et al., 2005. The new higher level classification of eukaryotes with emphasis on the taxonomy of protists. *The Journal of Eukaryotic Microbiology*, 52(5), pp.399-451. Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16248873> [Acedido Julho 6, 2011].
- Aksoy, S., 2011. Sleeping sickness elimination in sight: time to celebrate and reflect, but not relax. *PLoS neglected tropical diseases*, 5(2), p.e1008. Disponível em: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=3042998&tool=pmcentrez&rendertype=abstract> [Acedido Outubro 26, 2011].
- Aksoy, S. & Rio, R.V.M., 2005. Interactions among multiple genomes: tsetse, its symbionts and trypanosomes. *Insect biochemistry and molecular biology*, 35(7), pp.691-8. Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15894186> [Acedido Agosto 9, 2011].
- Aksoy, S. et al., 2001. Prospects for control of African trypanosomiasis by tsetse vector manipulation. *Trends in parasitology*, 17(1), pp.29-35. Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11137738>.
- Alberts, B. et al., 2002. Manipulating Proteins, DNA and RNA. In S. Gibbs, ed. *Molecular Biology of the Cell*. New York: Garland Science, pp. 469-546.
- Almeida, C.L., 1950. Relatório sobre os trabalhos de estudo das glossinas, efectuados até 1949. *Boletim Cultural da Guiné Portuguesa*, 5(17), pp.53-66.
- Artama, W.T., Agey, M.W. & Donelson, J.E., 1992. DNA comparisons of *Trypanosoma evansi* (Indonesia) and *Trypanosoma brucei* spp. *Parasitology*, 104(1), pp.67-74.

- Atouguia, J., 1998. *New Approaches to the Chemotherapy of Human African Trypanosomiasis - The Use of Topical Formulations in the Mouse Model*. University of Glasgow.
- Atouguia, J., 2005. *Tripanossomose Humana Africana* 1st ed. Universidade Aberta, ed., Lisboa: Universidade Aberta.
- Bacchi, C.J., 2009. Chemotherapy of human african trypanosomiasis. *Interdisciplinary perspectives on infectious diseases*, 2009, pp.1-5. Disponível em: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=2730475&tool=pmcentrez&rendertype=abstract> [Acedido Dezembro 12, 2011].
- Badjana, R., 2004. *Contribuição para o estudo de Glossina (DIPTERA, GLOSSINIDAE): Aspectos da evolução da colónia de glossinas/UEM/IHMT, a distribuição glossínica e o conhecimento da população sobre a mosca tsé-tsé, na Guiné-Bissau, em 2004*. Instituto de Higiene e Medicina Tropical, Universidade Nova de Lisboa.
- Baral, T.N., 2010. Immunobiology of African trypanosomes: need of alternative interventions. *Journal of biomedicine & biotechnology*, 2010, pp.1-24. Disponível em: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=2826769&tool=pmcentrez&rendertype=abstract> [Acedido Agosto 9, 2011].
- Barrett, M.P. et al., 2007. Human African trypanosomiasis: pharmacological re-engagement with a neglected disease. *British journal of pharmacology*, 152(8), pp.1155-71. Disponível em: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=2441931&tool=pmcentrez&rendertype=abstract> [Acedido Julho 25, 2011].
- Bartlett, J.M.S. & Stirling, D., 2003. A Short History of the Polymerase Chain Reaction. *PCR Protocols*, (226), pp.3-6.
- Becker, S. et al., 2004. Real-time PCR for detection of Trypanosoma brucei in human blood samples. *Diagnostic microbiology and infectious disease*, 50(3), pp.193-9. Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15541605> [Acedido Dezembro 11, 2011].
- Bell, A.S. & Ranford-Cartwright, L.C., 2002. Real-time quantitative PCR in parasitology. *Trends in parasitology*, 18(8), pp.337-42. Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12380021>.
- Brun, R. et al., 2010. Human African trypanosomiasis. *Lancet*, 375(9709), pp.148-59. Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19833383> [Acedido Julho 14, 2011].

- Burri, C. & Brun, R., 2009. Human African Trypanosomiasis. In G. C. Cook & A. I. Zumla, eds. *Manson's Tropical Diseases*. China: Saunders, Elsevier, pp. 1307 - 1325.
- Cattand, P., Jannin, J. & Lucas, P., 2001. Sleeping sickness surveillance: an essential step towards elimination. *Tropical medicine & international health*, 6(5), pp.348-61. Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11348530>.
- Cecchi, G. et al., 2009. Mapping sleeping sickness in Western Africa in a context of demographic transition and climate change. *Parasite*, 16(2), pp.99–106. Disponível em: http://www.parasite-journal.org/dwld/Par09-2_CECCHI_99-106.pdf [Acedido Dezembro 23, 2011].
- Challier, A., 1973. *Ecologie de Glossina palpalis gambiensis Vanderplank, 1949 (Diptera - Muscidae) en savane d'Afrique Occidentale*, Paris.
- Chappuis, F. et al., 2005. Options for field diagnosis of human African trypanosomiasis. *Clinical Microbiology Reviews*, 18(1), p.133. Disponível em: <http://cmr.asm.org/cgi/content/abstract/18/1/133> [Acedido Dezembro 23, 2011].
- Cordon-Obras, C. et al., 2010. Screening of *Trypanosoma brucei gambiense* in domestic livestock and tsetse flies from an insular endemic focus (Luba, Equatorial Guinea). *PLoS neglected tropical diseases*, 4(6), p.e704. Disponível em: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=2882337&tool=pmcentrez&rendertype=abstract> [Acedido Dezembro 3, 2011].
- Cortes, S. et al., 2004. PCR as a rapid and sensitive tool in the diagnosis of human and canine leishmaniasis using *Leishmania donovani* s.l. -specific kinetoplastid primers. *Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene*, 98, pp.12-17.
- Covell, G., 1955. Tsetse Flies. *British medical journal*, 2(4946), p.1014. Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20719583>.
- Cox, A. et al., 2005. A PCR based assay for detection and differentiation of African trypanosome species in blood. *Experimental parasitology*, 111(1), pp.24-9. Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16054487> [Acedido Dezembro 17, 2011].
- Crespo, M.V. & Rosa, F., 2004. Parasitological fauna in farm animals from Cape Verde Islands and Guinea-Bissau (West Africa). In *IX European Multicollloquium of Parasitology*. Valencia, p. 464.
- Eisler, M.C. et al., 2004. Diagnosis and Epidemiology of African Animal Trypanosomiasis. In Ian Maudlin, P. H. Holmes, & M. A. Miles, eds. *The Trypanosomiases*. Wallingford: CABI Publishing, p. 608.

- Ferreira, F.S.C., 1947. Acerca da doença do sono na Guiné Portuguesa. *Boletim Cultural da Guiné Portuguesa*, 2(6), pp.363-374.
- Ferreira, F.S.C., 1946. Missão de estudo e combate da doença do sono na Guiné Portuguesa. Sobre a biologia de *Glossina palpalis* da Guiné Portuguesa. *Anais do Instituto de Medicina Tropical*, 3, pp.93-141.
- Fèvre, E.M. et al., 2008. The burden of human African trypanosomiasis. *PLoS neglected tropical diseases*, 2(12), p.e333. Disponível em: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=2602597&tool=pmcentrez&rendertype=abstract> [Acedido Junho 15, 2011].
- Gautret, P. et al., 2009. Imported Human African Trypanosomiasis in Europe, 2005-2009. *Name: Eurosurveillance*, 14, p.3. Disponível em: <http://dSPACE.itg.be/handle/10390/2795> [Acedido Dezembro 18, 2011].
- Geysen, D., Delespaux, V. & Geerts, S., 2003. PCR-RFLP using *Ssu-rDNA* amplification as an easy method for species-specific diagnosis of *Trypanosoma* species in cattle. *Veterinary parasitology*, 110(3-4), pp.171-80. Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12482646>.
- Gibson, W.C., 2002. Epidemiology and diagnosis of African trypanosomiasis using DNA probes. *Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene*, 96(Supplement 1), p.S1/141–S1/143. Disponível em: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0035920302900660> [Acedido Dezembro 23, 2011].
- Gibson, W.C., 2007. Resolution of the species problem in African trypanosomes. *International journal for parasitology*, 37(8-9), pp.829-38. Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17451719> [Acedido Dezembro 12, 2011].
- Gibson, W.C., Dukes, P. & Gashumba, J.K., 1988. Species-specific DNA probes for the identification of African trypanosomes in tsetse flies. *Parasitology*, 97(01), pp.63-73. Disponível em: http://journals.cambridge.org/abstract_S0031182000066749 [Acedido Janeiro 22, 2012].
- Ginzinger, D.G., 2002. Gene quantification using real-time quantitative PCR: an emerging technology hits the mainstream. *Experimental hematology*, 30(6), pp.503-12. Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12063017>.
- De Greef, C. et al., 1992. Only the serum-resistant bloodstream forms of *Trypanosoma brucei rhodesiense* express the serum resistance associated (SRA) protein. *Annales de la Société Belge de Médecine Tropicale*, 72(1), pp.13-21.
- Grácio, A.J.S., 1999. Tsetse flies (DIPTERA: GLOSSINIDAE) and African Trypanosomiasis in Guinea Bissau, West Africa. *Acta Parasitológica Portuguesa*, 2(1/2), pp.51-56.

- Hainard, A. et al., 2009. A combined CXCL10, CXCL8 and H-FABP panel for the staging of human African trypanosomiasis patients. *PLoS neglected tropical diseases*, 3(6), p.e459. Disponível em: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=2696178&tool=pmcentrez&rendertype=abstract> [Acedido Novembro 16, 2011].
- Hao, Z., Kasumba, I. & Aksoy, S., 2003. Proventriculus (cardia) plays a crucial role in immunity in tsetse fly (Diptera: Glossinidae). *Insect Biochemistry and Molecular Biology*, 33(11), pp.1155-1164. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1016/j.ibmb.2003.07.001> [Acedido Novembro 26, 2011].
- Hoare, C.A., 1972. *The trypanosomes of mammals: a zoological monograph*, Oxford: Blackwell Scientific Publications. Disponível em: <http://www.getcited.org/pub/101370768> [Acedido Dezembro 29, 2011].
- Instituto Nacional de Estatística e Censos, 2005. *GUINÉ-BISSAU EM NÚMEROS 2005*, Bissau.
- Jaenson, T.G.T., Dos Santos, R.C.B. & Hall, D.R., 1991. Attraction of *Glossina longipalpis* (Diptera: Glossinidae) in Guinea-Bissau to Odor-Baited Biconical Traps. *Journal of Medical Entomology*, 28(2), pp.284-286. Disponível em: <http://www.ingentaconnect.com/content/esa/jme/1991/00000028/00000002/art00018> [Acedido Janeiro 21, 2012].
- Krafsur, E.S., 2009. Tsetse flies: genetics, evolution, and role as vectors. *Infection, Genetics and Evolution*, 2009(1), pp.124-141. Disponível em: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1567134808001792> [Acedido Dezembro 23, 2011].
- Kristjanson, P.M. et al., 1999. Measuring the costs of African animal trypanosomosis, the potential benefits of control and returns to research. *Agricultural Systems*, 59(1), pp.79-98. Disponível em: <http://www.worldagroforestry.org/downloads/publications/PDFs/ja99058.pdf> [Acedido Dezembro 23, 2011].
- Kukla, B.A. et al., 1987. Use of species-specific DNA probes for detection and identification of trypanosome infection in tsetse flies. *Parasitology*, 95(01), pp.1-16. Disponível em: http://journals.cambridge.org/abstract_S0031182000057498 [Acedido Janeiro 22, 2012].
- Kuzoe, F.A.S. & Schofield, C.J., 2004. *Strategic review of traps and targets for tsetse and African trypanosomiasis control*, Geneva. Disponível em: <http://scholar.google.com/scholar?hl=en&btnG=Search&q=intitle:STRATEGIC+REVIEW+OF+TRAPS+AND+TARGETS+FOR+TSETSE+AND+AFRICAN+TRYPANOSOMIASIS+CONTROL#0> [Acedido Dezembro 23, 2011].

- Leak, S.G.A., 1999. *Tsetse biology and ecology: their role in the epidemiology and control of trypanosomosis* 1st ed., Nairobi: CABI Publishing. Disponível em: http://books.google.com/books?hl=en&lr=&id=J1latecW1BQC&oi=fnd&pg=PR16&dq=Tsetse+Biology+and+ecology&ots=-g0T2WBPbT&sig=_M0p2QVn6EhgDVspHs7vSVhCGc4 [Acedido Dezembro 27, 2011].
- Levine, N.D. et al., 1980. A Newly Revised Classification of the Protozoa. *The Journal of Eukaryotic Microbiology*, 27(1), pp.37-58. Disponível em: <http://doi.wiley.com/10.1111/j.1550-7408.1980.tb04228.x> [Acedido Dezembro 28, 2011].
- Lightner, L. & Roberts, L.W., 1984. Mechanical transmission of *Leishmania major* by *Glossina morsitans morsitans* (Diptera: Glossinidae). *Journal of Medical Entomology*, 21(2), pp.243-243.
- Lin, M. et al., 2000. Real-time PCR for quantitative detection of *Toxoplasma gondii*. *Journal of clinical microbiology*, 38(11), pp.4121-4125. Disponível em: <http://jcm.asm.org/cgi/content/abstract/38/11/4121> [Acedido Janeiro 23, 2012].
- Lloyd, L. & Johnson, W.B., 1924. The trypanosome infections of tsetse flies in Northern Nigeria and a new method of estimation. *Bulletin of Entomological Research*, 14(3), pp.265-288.
- Mackay, I.M., 2004. Real-time PCR in the microbiology laboratory. *Clinical Microbiology and Infection*, 10(3), pp.190-212. Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15008940>.
- Malele, I.I. et al., 2003. The use of specific and generic primers to identify trypanosome infections of wild tsetse flies in Tanzania by PCR. *Infection, Genetics and Evolution*, 3(4), pp.271-279. Disponível em: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S156713480300090X> [Acedido Novembro 20, 2011].
- Maroco, J., 2010. *Análise estatística com utilização do SPSS* 3rd ed. M. Robalo, ed., Lisboa: Edições Sílabo, LDA.
- Masake, R.A. et al., 1997. Sensitive and Specific Detection of *Trypanosoma vivax* using the Polymerase Chain Reaction. *Experimental Parasitology*, 85(2), pp.193-205.
- Masake, R.A. et al., 1994. A species-specific antigen of *Trypanosoma* (Duttonella) *vivax* detectable in the course of infection is encoded by a differentially expressed tandemly reiterated gene. *Molecular and biochemical parasitology*, 64(2), pp.207-18. Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/7935599> [Acedido Janeiro 22, 2012].

- Masiga, D.K. et al., 1992. Sensitive detection of trypanosomes in tsetse flies by DNA amplification. *International Journal for Parasitology*, 22(7), pp.909-918.
- McNamara, J.J., Laveissiere, C. & Masiga, D.K., 1995. Multiple trypanosome infections in wild tsetse in Côte d'Ivoire detected by PCR analysis and DNA probes. *Acta tropica*, 59(2), pp.85-92. Disponível em: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/0001706X9400087H> [Acedido Dezembro 23, 2011].
- Monis, P.T. et al., 2005. Emerging technologies for the detection and genetic characterization of protozoan parasites. *Trends in parasitology*, 21(7), pp.340-6. Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15925542> [Acedido Agosto 31, 2011].
- Morrison, L.J. et al., 2008. *Trypanosoma brucei gambiense* Type 1 populations from human patients are clonal and display geographical genetic differentiation. *Infection, Genetics and Evolution*, 8(6), pp.847-54. Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18790085> [Acedido Setembro 29, 2011].
- Moser, D.R. et al., 1989. Detection of *Trypanosoma congolense* and *Trypanosoma brucei* subspecies by DNA amplification using the polymerase chain reaction. *Parasitology*, 99(1), pp.57-66. Disponível em: <http://journals.cambridge.org/production/action/cjoGetFulltext?fulltextid=4178268> [Acedido Dezembro 23, 2011].
- Mulligan, H.W. & Potts, W.H., 1970. *The African Trypanosomiases* 1st ed. Wiley Intersciences, ed., Londres.
- Ndung'u, J.M., Bieler, S. & Roscigno, G., 2010. "Piggy-backing" on diagnostic platforms brings hope to neglected diseases: the case of sleeping sickness. *PLoS neglected tropical diseases*, 4(5), p.e715. Disponível em: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=2876120&tool=pmcentrez&rendertype=abstract> [Acedido Novembro 28, 2011].
- Njiru, Z.K. et al., 2005. The use of ITS1 rDNA PCR in detecting pathogenic African trypanosomes. *Parasitology research*, 95(3), pp.186-92. Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15619129> [Acedido Novembro 20, 2011].
- O Primeiro de Janeiro, 1950. Como está decorrendo o combate à doença do sono. *Boletim Geral das Colônias*, 16(298), pp.174-177.
- Perandin, F. et al., 2004. Development of a real-time PCR assay for detection of *Plasmodium falciparum*, *Plasmodium vivax*, and *Plasmodium ovale* for routine clinical diagnosis. *Journal of clinical microbiology*, 42(3), pp.1214-1219. Disponível em: <http://jcm.asm.org/cgi/content/abstract/42/3/1214> [Acedido Janeiro 23, 2012].

- Pfaffl, M.W., 2004. Quantification strategies in real-time PCR. *AZ of quantitative PCR*, 1, pp.89–113. Disponível em: <http://www.gmo-qpcr-analysis.com/chapter-3-pfaffl.pdf> [Acedido Dezembro 23, 2011].
- Picozzi, K., Carrington, M. & Welburn, S.C., 2008. A multiplex PCR that discriminates between *Trypanosoma brucei brucei* and zoonotic *T. b. rhodesiense*. *Experimental parasitology*, 118(1), pp.41-6. Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17643434> [Acedido Dezembro 12, 2011].
- Piesman, J. & Schneider, B.S., 2001. Use of quantitative PCR to measure density of *Borrelia burgdorferi* in the midgut and salivary glands of feeding tick vectors. *Journal of clinical microbiology*, 39(11), pp.4145-4148. Disponível em: <http://jcm.asm.org/cgi/content/abstract/39/11/4145> [Acedido Janeiro 23, 2012].
- Radwanska, M. et al., 2002. Novel primer sequences for polymerase chain reaction-based detection of *Trypanosoma brucei gambiense*. *The American journal of tropical medicine and hygiene*, 67(3), pp.289-95. Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12408669>.
- Roditi, I. & Lehane, M.J., 2008. Interactions between trypanosomes and tsetse flies. *Current opinion in microbiology*, 11(4), pp.345-51. Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18621142> [Acedido Setembro 21, 2011].
- Rolão, N., 2004. *O parasitismo e a resposta imunitária local em murganhos BALB / c infectados por Leishmania infantum*. Universidade Nova de Lisboa.
- Rolão, N. et al., 2004. Quantification of *Leishmania infantum* parasites in tissue biopsies by real-time polymerase chain reaction and polymerase chain reaction-enzyme-linked immunosorbent assay. *The Journal of parasitology*, 90(5), pp.1150-4. Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15562617>.
- Sharma, R. et al., 2009. The heart of darkness: growth and form of *Trypanosoma brucei* in the tsetse fly. *Trends in parasitology*, 25(11), pp.517-24. Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19747880> [Acedido Agosto 31, 2011].
- Simarro, P.P. et al., 2010. The Atlas of human African trypanosomiasis: a contribution to global mapping of neglected tropical diseases. *International journal of health geographics*, 9(1), p.57. Disponível em: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=2988709&tool=pmcentrez&rendertype=abstract> [Acedido Agosto 19, 2011].
- Simarro, P.P. et al., 2011. The human African trypanosomiasis control and surveillance programme of the World Health Organization 2000-2009: the way forward. *PLoS neglected tropical diseases*, 5(2), p.e1007. Disponível em: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=3042999&tool=pmcentrez&rendertype=abstract> [Acedido Agosto 25, 2011].

- Smith, D.H., Pepin, J. & Stich, A.H., 1998. Human African trypanosomiasis: an emerging public health crisis. *British medical bulletin*, 54(2), pp.341-55. Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9830201>.
- Stevens, J.R. et al., 1999. The ancient and divergent origins of the human pathogenic trypanosomes, *Trypanosoma brucei* and *T. cruzi*. *Parasitology*, 118 (Pt 1, pp.107-16. Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10070668>.
- Steverding, D., 2008. The history of African trypanosomiasis. *Parasites & vectors*, 1(1), p.3. Disponível em: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=2270819&tool=pmcentrez&rendertype=abstract> [Acedido Junho 20, 2011].
- Stuart, K. et al., 2008. Kinetoplastids: related protozoan pathogens, different diseases. *The Journal of clinical investigation*, 118(4), p.1301. Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC2276762/> [Acedido Dezembro 23, 2011].
- Swallow, B.M., 1999. *Impacts of trypanosomiasis on African agriculture*, Nairobi.
- Vickerman, K. et al., 1988. Biology of African trypanosomes in the tsetse fly. *Biology of the cell / under the auspices of the European Cell Biology Organization*, 64(2), pp.109-19. Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/3067793>.
- Vingerhoets, L.M.A. et al., 2011. Treatment and follow-up using microscopy and polymerase chain reaction in East African sleeping sickness: a case report. *Grand Rounds*, 11(1), pp.12-16. Disponível em: <http://www.grandrounds-e-med.com/articles/gr110003.htm> [Acedido Janeiro 22, 2012].
- Voet, D. & Voet, J.G., 2004. Nucleic Acids, Gene Expression, and Recombinant DNA Technology. In D. Harris & P. Fitzgerald, eds. *Biochemistry*. New Jersey: John Wiley and Sons, pp. 80-126.
- WHO, 2010a. African trypanosomiasis (sleeping sickness). *Fact Sheet N° 259*. Disponível em: <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs259/en/index.html> [Acedido Janeiro 14, 2012].
- WHO, 1986. *Epidemiology and control of African trypanosomiasis: report of a WHO Expert Committee*, Geneva. Disponível em: <http://scholar.google.com/scholar?hl=en&btnG=Search&q=intitle:Epidemiology+and+control+of+African+trypanosomiasis#0> [Acedido Dezembro 28, 2011].
- WHO, 2010b. *Working to overcome the global impact of neglected tropical diseases*, Geneva.
- WHO Expert Committee on the Control of Leishmaniasis, 2010. *Control of the leishmaniasis*, Geneva.

Lista de Figuras

Figura 1 - Representação gráfica da morfologia de tripomastigota e de epimastigota.....	6
Figura 2 - Mapa da distribuição de <i>Glossina</i> no continente africano	14
Figura 3 – Número de casos de THA e população rastreada (1939-1999).....	17
Figura 4 - Mapa de África, com linha divisória entre os locais de transmissão de <i>T. b. gambiense</i> (esquerda da linha) e <i>T. b. rhodesiense</i> (direita da linha).....	18
Figura 5 - Representação esquemática de parte do gene que codifica para o ARN ribossomal de <i>Trypanosoma</i> spp.....	30
Figura 6 - Modo de atuação do corante <i>SYBR® Green I</i>	32
Figura 7 - Modo de atuação da sonda de hibridação <i>Taqman®</i>	33
Figura 8 - Mapa da RGB, evidenciando as zonas de captura das glossinas utilizadas..	43
Figura 9 – Dissecção de <i>Glossina palpalis gambiense</i> como preparação para posterior extração de ADN	44
Figura 10 - Estudo de sensibilidade da técnica de PCR-RFLP com primers Tryp18S.	69
Figura 11 - Exemplo de gel de agarose com produtos de PCR após restrição com enzima Tfil.....	70
Figura 12 - Eletroforese do ADN amplificado com <i>primers</i> MC1/MC2.	72
Figura 13 - Gel agarose com amostras após PCR convencional com <i>primers</i> Tb177 ..	82
Figura 14 - Mapa da RGB, mostrando a identificação dos diversos tripanossomas identificados, por região.	84

Lista de Tabelas

Tabela 1 - Classificação do género <i>Trypanosoma</i>	3
Tabela 2 - Classificação sistemática do género <i>Glossina</i> Wiedemann 1830.....	7
Tabela 3 - Espécies e subespécies de <i>Glossina</i> , consoante o subgénero (grupo)	8
Tabela 4 - Regiões anatómicas do sistema digestivo de <i>Glossina</i> envolvidas no desenvolvimento de diferentes espécies de tripanossomas.....	12
Tabela 5 - Glossinas da Região de Biombo	40
Tabela 6 - Glossinas da Região de Tombali	41
Tabela 7 - Glossinas da Região de Bolama-Bijagós	41
Tabela 8 - Glossinas da Região de Gabú	42
Tabela 9 - Condições de PCR utilizando os <i>primers</i> Tb177.....	48
Tabela 10 - Condições de PCR em tempo real com <i>SYBR® Green I</i>	49
Tabela 11 - Condições de PCR em tempo real com sonda <i>Taqman®</i>	50
Tabela 12 - Produto esperado após restrição com enzima <i>TfiI</i>	54
Tabela 13 - Coeficiente de correlação e eficiência dos <i>primers</i> Tryp18S e Tryp18S2 .	60
Tabela 14 - Determinação da variabilidade intra-ensaio	63
Tabela 15 – Determinação da variabilidade inter-ensaio.....	64
Tabela 16 - Tamanho do produto amplificado com <i>primers</i> Tryp18S e temperaturas de dissociação teóricas obtidas com o programa <i>OligoCalc</i>	65
Tabela 17 - Sequências de ADN amplificado dos genes 18S das diferentes espécies de <i>Trypanosoma</i> , e tamanho esperado do produto de PCR após digestão com enzima <i>TfiI</i>	68
Tabela 18 - Sequência do gene 18S de <i>Leishmania major</i>	71
Tabela 19 - Número e percentagem de amostras positivas.....	73

Tabela 20 - Identificação das amostras consideradas <i>Trypanosoma</i> spp. após análise das curvas de dissociação	77
Tabela 21 - Identificação preliminar das amostras com infecção mista após análise das curvas de dissociação (<i>SYBR® Green I</i>).....	78
Tabela 22 - Comparação entre amostras identificadas como infecções mistas que, após PCR-RFLP foram identificadas conclusivamente como infecções monoespecíficas	79
Tabela 23 - Identificação conclusiva de amostras apresentando infecções mistas.....	80
Tabela 24 - Amostras enviadas para sequenciação e sua identificação	81
Tabela 25 - Caracterização da amostra, quanto à infecção por <i>Trypanosoma</i> spp.....	85

Lista de Gráficos

Gráfico 1 - Curva de calibração com <i>primers</i> Tryp18S e sistema <i>SYBR® Green I</i>	59
Gráfico 2 - Curva de calibração com <i>primers</i> Tryp18S2 e sistema <i>Taqman®</i>	60
Gráfico 3 - Gráfico de amplificação do controlo negativo em ambos os sistemas.....	61
Gráfico 4 - Exemplo de curva de amplificação das réplicas do estudo de variabilidade intra-ensaio dos <i>primers</i> Tryp18S2.....	62
Gráfico 5 – PCR em tempo real para avaliação da especificidade do par de <i>primers</i> Tryp18S2.	63
Gráfico 6 - Curvas de dissociação das diferentes espécies.	66
Gráfico 7 - Exemplo de curvas de dissociação no sistema <i>SYBR® Green I</i>	66
Gráfico 8 – Curva de dissociação de uma amostra não infetada de <i>Glossina morsitans</i>	67
Gráfico 9 - Distribuição do número de glossinas positivas e negativas, por sexo.....	74
Gráfico 10 - Número de glossinas infetadas por espécie de tripanossoma.....	75

Gráfico 11 - Identificação presuntiva após análise das curvas de dissociação (<i>SYBR® Green I</i>).....	76
Gráfico 12 – Caixa de bigodes mostrando a distribuição do número de parasitas nas amostras consideradas <i>Trypanosoma</i> spp. após análise das curvas de dissociação (<i>primers Tryp18S</i>)	77
Gráfico 13 - Identificação conclusiva das amostras, em todas as áreas estudadas da RGB	78
Gráfico 14 - Gráfico caixa de bigodes apresentando os valores médios de parasitas para as amostras identificadas como sendo <i>Trypanosoma</i> spp. após PCR-RFLP	80

Lista de Equações

Equação 1 - Fórmula para calcular a eficiência da reação de PCR em tempo real, utilizando uma curva de calibração.	34
Equação 2 - Fórmula para cálculo da variabilidade intra-ensaio.....	52
Equação 3 - Fórmula para cálculo da variabilidade inter-ensaio.....	52

ANEXO I - Número de glossinas infetadas, por sexo

Case Processing Summary

	Cases					
	Valid		Missing		Total	
	N	Percent	N	Percent	N	Percent
Gênero das moscas *	762	100,0%	0	,0%	762	100,0%
Positividade das amostras						

Gênero das moscas * Positividade das amostras Crosstabulation

			Positividade das amostras		Total
			Positivo	Negativo	
Gênero das moscas	Masculino	Count	133	368	501
		Expected Count	158,5	342,5	501,0
	Feminino	Count	108	153	261
		Expected Count	82,5	178,5	261,0
Total		Count	241	521	762
		Expected Count	241,0	521,0	762,0

Chi-Square Tests^c

	Value	df	Asymp. Sig. (2-sided)	Exact Sig. (2-sided)	Exact Sig. (1-sided)
Pearson Chi-Square	17,458 ^a	1	,000	,000	,000
Continuity Correction ^b	16,779	1	,000		
Likelihood Ratio	17,136	1	,000	,000	,000
Fisher's Exact Test				,000	,000
N of Valid Cases	762				

a. 0 cells (,0%) have expected count less than 5. The minimum expected count is 82,55.

b. Computed only for a 2x2 table

c. For 2x2 crosstabulation, exact results are provided instead of Monte Carlo results.

ANEXO II - Carga parasitária média, por sexo

Case Processing Summary

Sexo das moscas		Cases					
		Valid		Missing		Total	
		N	Percent	N	Percent	N	Percent
Nº parasitas amostras positivas	Masculino	128	25,5%	373	74,5%	501	100,0%
	Feminino	103	39,5%	158	60,5%	261	100,0%

Descriptives

Sexo das moscas				Statistic	Std. Error
Nº parasitas amostras positivas	Masculino	Mean		1995,3383	1089,58735
		95% Confidence Interval for Mean	Lower Bound	-160,7584	
			Upper Bound	4151,4351	
		5% Trimmed Mean		140,2927	
		Median		2,3445	
		Variance		1,520E8	
		Std. Deviation		12327,27372	
		Minimum		1,00	
		Maximum		128097,79	
		Range		128096,79	
		Interquartile Range		12,33	
		Skewness		8,998	,214
		Kurtosis		88,697	,425
	Feminino	Mean		3597,6781	1451,79364
		95% Confidence Interval for Mean	Lower Bound	718,0523	
			Upper Bound	6477,3039	
		5% Trimmed Mean		889,9749	
		Median		4,2730	
		Variance		2,171E8	
		Std. Deviation		14734,09627	
		Minimum		1,00	
		Maximum		119062,63	
		Range		119061,62	
		Interquartile Range		15,14	
		Skewness		5,952	,238
		Kurtosis		40,709	,472

Tests of Normality

Sexo das moscas		Kolmogorov-Smirnov ^a			Shapiro-Wilk		
		Statistic	df	Sig.	Statistic	df	Sig.
Nº parasitas amostras positivas	Masculino	,445	128	,000	,152	128	,000
	Feminino	,450	103	,000	,267	103	,000

a. Lilliefors Significance Correction

Test of Homogeneity of Variance

		Levene Statistic	df1	df2	Sig.
Nº parasitas amostras positivas	Based on Mean	2,750	1	229	,099
	Based on Median	,809	1	229	,369
	Based on Median and with adjusted df	,809	1	221,902	,369
	Based on trimmed mean	1,478	1	229	,225

Ranks

Sexo das moscas		N	Mean Rank	Sum of Ranks
Nº parasitas amostras positivas	Masculino	128	109,74	14046,50
	Feminino	103	123,78	12749,50
	Total	231		

Test Statistics^a

	Nº parasitas amostras positivas
Mann-Whitney U	5790,500
Wilcoxon W	14046,500
Z	-1,588
Asymp. Sig. (2-tailed)	,112
Exact Sig. (2-tailed)	,113
Exact Sig. (1-tailed)	,056
Point Probability	,000

a. Grouping Variable: Sexo das moscas